



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **05227970 A**(43) Date of publication of application: **07.09.93**

(51) Int. Cl

**C12N 15/13**  
**C07K 15/06**  
**C12N 15/10**  
**C12P 21/08**  
**C12Q 1/68**  
**// C07K 15/28**  
**C12N 5/20**  
**C12N 15/06**  
**(C12P 21/08 , C12R 1:91 )**

(21) Application number: **04032084**(22) Date of filing: **19.02.92**(71) Applicant: **CHUGAI PHARMACEUT CO LTD**

(72) Inventor: **TSUCHIYA MASAYUKI**  
**SATO ISAO**  
**MEARII MAAGARETSUTO**  
**BENDEITSUGU**  
**SUTEIIBUN TAREN JIYOONZU**  
**HOSE UIRIAMU SARUDANA**

**(54) RECONSTRUCTED HUMAN ANTIBODY TO**  
**HUMAN INTERLEUKIN-6 RECEPTOR**

**(57) Abstract:**

**PURPOSE:** To provide a novel L-chain V-region which can be used to obtain an antibody of low immunogenicity against anti-human IL-6R antibody useful as a therapeutic agent for myeloma.

**CONSTITUTION:** In the light chain (L-chain) versatile region (V-region) of mouse monoclonal antibody against human interleukin-6 receptor (IL-6R), for example, the amino acid sequence of the formula is included. The strain of Escherichia coli containing plasmid p12-k2 having the gene encoding the mouse k-type L- chain V-region originating from hybridoma AUK 12-20 has the deposit number: NCIMB 40367, and the L-chain V-region of monoclonal antibody AUK 12-20 has the exemplified amino acid sequence.

COPYRIGHT: (C)1993,JPO&amp;Japio

48  
 96  
 144  
 192  
 240  
 288  
 336  
 384  
 383  
 110

ATG GAG TCA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA CTG CTG CTC TGG GTT CCA  
 Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
 -20 -15 -10 -5  
 GGT TCC ACT GGT GAC ATT GTG CTG ACA CAG TCT CCT GCT TCC TTA GGT  
 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Glu Ser Pro Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10  
 GTA TCT CTG GCG CAG AGG GGC ACC ATC TCA TCC AGG GGC AGC AAA AGT  
 Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser  
 15 20 25  
 GTC AGT ACA TCT GGC TAT AGT TAT ATG CAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA  
 Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Glu Glu Lys Pro  
 30 35 40  
 GGA CAG ACA CCG AAA CTC CTC ATC TAT CTT GCA TCC AAC CTA GAA TCT  
 Gly Glu Thr Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
 45 50 55 60  
 GCG CTC CCT GCG AGG TTC AGT GGC AGT GCG TCT GCG ACA CAG TTC ACC  
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 65 70 75  
 CTC AAC ATC CAG CTT GTG GAG GAG CAG CAG GCT GCA ACC TAT TAC TGT  
 Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 80 85 90  
 CAG CAG AGT AGG GAG AAT CCG TAC ACG TTC GGA GCG CCG ACC AAG CTC  
 Glu His Ser Arg Glu Asn Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu  
 95 100 105  
 GAA ATA AAA  
 Glu Ile Lys  
 110

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-227970

(43)公開日 平成5年(1993)9月7日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/13	Z N A	8619-4H		
C 0 7 K 15/06				
C 1 2 N 15/10		7236-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		8931-4B	15/ 00	C
審査請求 未請求 請求項の数49(全 49 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平4-32084

(22)出願日 平成4年(1992)2月19日

(71)出願人 000003311

中外製薬株式会社

東京都北区浮間5丁目5番1号

(72)発明者 土屋 政幸

静岡県御殿場市駒門1-135 中外製薬株式会社内

(72)発明者 佐藤 功

静岡県御殿場市駒門1-135 中外製薬株式会社内

(74)代理人 弁理士 青木 朗 (外4名)

最終頁に続く

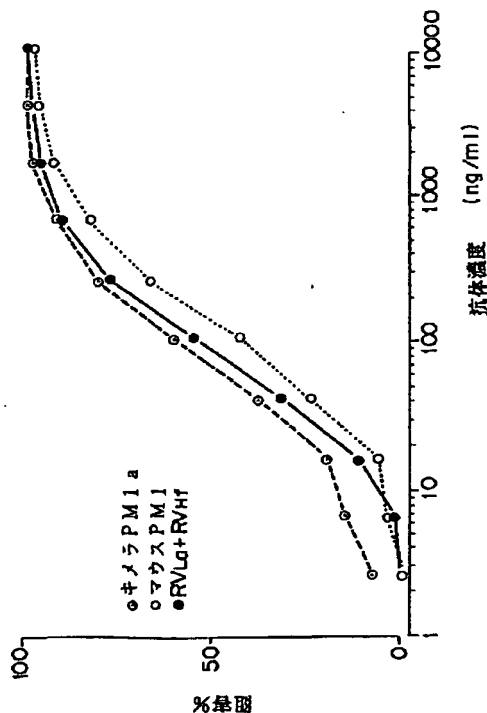
(54)【発明の名称】 ヒトインターロイキン-6受容体に対する再構成ヒト抗体

(57)【要約】

【構成】 (A) (1) ヒトL鎖C領域、及び(2) ヒトL鎖FR、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖CDRを含んでL鎖V領域、を含んで成るL鎖；並びに

(B) (1) ヒトH鎖C領域、及び(2) ヒトH鎖FR、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖CDRを含んで成るH鎖V領域を含んで成るH鎖；を含んで成るヒトIL-6Rに対する再構成された抗体。

【効果】 本発明はヒトIL-6Rに対する再構成ヒト化抗体を提供し、この抗体においては、ヒト抗体のV領域のCDRがヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のCDRにより置き換えられている。この再構成ヒト抗体の大部分がヒト抗体に由来し、そしてマウスCDRは抗原性が低いから、本発明の再構成ヒト抗体はヒトに対する抗原性が低く、そしてそれ故に療法用として期待される。



1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトインターロイキン-6受容体（IL-6R）に対するマウスモノクローナル抗体のライト鎖（L鎖）可変領域（V領域）。

【請求項2】 配列番号24、26、28及び30のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する請求項1に記載のL鎖V領域。

【請求項3】 ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のヘビー鎖（H鎖）V領域。

【請求項4】 配列番号25、27、29及び31のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する請求項3に記載のH鎖V領域。

【請求項5】 （1）ヒトL鎖定常領域（C領域）、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域を含んで成るL鎖；並びに

（2）ヒトH鎖C領域、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域を含んで成るH鎖；を含んで成るキメラ抗体。

【請求項6】 前記マウスL鎖V領域が配列番号24、26、28及び30のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、そして前記マウスH鎖V領域が配列番号25、27、29及び31のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する、請求項5に記載のキメラ抗体。

【請求項7】 ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域の相補性決定領域（CDR）。

【請求項8】 配列番号24、26、28及び30のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の範囲が表6により定義される、請求項7に記載のCDR。

【請求項9】 ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDR。

【請求項10】 配列番号25、27、29及び31のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の範囲が表6により定義される、請求項9に記載のCDR。

【請求項11】 表3及び表4にRV<sub>H</sub>a、RV<sub>H</sub>b、RV<sub>H</sub>c、RV<sub>H</sub>d、RV<sub>H</sub>e、又はRV<sub>H</sub>fとして示されるアミノ酸配列を有する、請求項9に記載のCDR。

【請求項12】 （1）ヒトL鎖V領域のフレームワーク領域（FR）、及び（2）ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDR、を含んで成るヒトIL-6Rに対する抗体の再構成（reshaped）ヒトL鎖V領域。

【請求項13】 前記CDRが配列番号24、26、28及び30のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の範囲が表6により定義される、請求項12に記載の再構成ヒトL鎖V領域。

【請求項14】 前記FRがヒト抗体REIに由来する、請求項12に記載の再構成ヒトL鎖V領域。

2

【請求項15】 （1）ヒトH鎖V領域のFR、及び（2）ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDR、を含んで成る、ヒトIL-6Rに対する抗体の再構成ヒトH鎖V領域。

【請求項16】 前記CDRが配列番号25、27、29及び31のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の範囲が表6により定義される、請求項15に記載の再構成ヒトH鎖V領域。

【請求項17】 前記FRがヒト抗体NEWに由来する、請求項15に記載の再構成ヒトH鎖V領域。

【請求項18】 表3及び表4にRV<sub>H</sub>a、RV<sub>H</sub>b、RV<sub>H</sub>c、RV<sub>H</sub>d、RV<sub>H</sub>e、又はRV<sub>H</sub>fとして示されるアミノ酸配列を有する、請求項15に記載の再構成ヒトH鎖V領域。

【請求項19】 （A）（1）ヒトL鎖C領域、及び（2）ヒトL鎖FR、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖CDRを含んで成るL鎖V領域、を含んで成るL鎖；並びに

（B）（1）ヒトH鎖C領域、及び（2）ヒトH鎖FR、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖CDRを含んで成るH鎖V領域、を含んで成るヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体。

【請求項20】 前記L鎖CDRが配列番号24、26、28及び30のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し；該アミノ酸配列の範囲が表6に定義される通りであり；H鎖CDRが配列番号25、27、29及び31のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の範囲が表6において定義される通りであり；ヒトL鎖FRがREIに由来し；前記ヒトH鎖FRがNEWに由来し、前記ヒトL鎖C領域はヒトγ-1C領域であり；そして前記ヒトH鎖C領域はヒトκC領域である、請求項19に記載の再構成ヒト抗体。

【請求項21】 前記H鎖V領域が表3及び表4にRV<sub>H</sub>a、RV<sub>H</sub>b、RV<sub>H</sub>c、RV<sub>H</sub>d、RV<sub>H</sub>e、又はRV<sub>H</sub>fとして示されるアミノ酸配列を有する、請求項19に記載の再構成ヒト抗体。

【請求項22】 ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域をコードするDNA。

【請求項23】 前記L鎖V領域が配列番号24、26、28及び30のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する、請求項22に記載のDNA。

【請求項24】 ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域をコードするDNA。

【請求項25】 前記H鎖V領域が配列番号25、27、29及び31のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する、請求項24に記載のDNA。

【請求項26】 ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDRをコードするDNA。

【請求項27】 前記CDRが配列番号24, 26, 28及び30のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の範囲が表3及び表4に定義される請求項26に記載のCDRをコードするDNA。

【請求項28】 ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDRをコードするDNA。

【請求項29】 前記CDRが配列番号25, 27, 29及び31のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の範囲が表6において定義される、請求項28に記載のCDRをコードするDNA。

【請求項30】 前記CDRが表3及び表4においてRV<sub>H</sub>a, RV<sub>H</sub>b, RV<sub>H</sub>c, RV<sub>H</sub>d, RV<sub>H</sub>e, 又はRV<sub>H</sub>fとして示されるアミノ酸配列を有する、請求項28に記載のCDRをコードするDNA。

【請求項31】 (1) ヒトL鎖V領域のFR、及び(2) ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDR、を含んで成る、ヒトIL-6Rに対する抗体の再構成ヒトL鎖V領域をコードするDNA。

【請求項32】 前記CDRが配列番号24, 26, 28及び30のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の範囲が表6に定義される、請求項31に記載の再構成ヒトL鎖V領域をコードするDNA。

【請求項33】 前記FRがREIに由来する、請求項31に記載の再構成ヒトL鎖V領域をコードするDNA。

【請求項34】 (1) ヒトH鎖V領域のFR、及び(2) ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDR、を含んで成る、ヒトIL-6Rに対する抗体の再構成ヒトH鎖V領域をコードするDNA。

【請求項35】 前記CDRが配列番号25, 27, 29及び31のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の範囲が表6に定義される、請求項34に記載の再構成ヒトH鎖V領域をコードするDNA。

【請求項36】 前記FRがNEWに由来する、請求項34に記載の再構成H鎖V領域をコードするDNA。

【請求項37】 前記FRが表3及び表4にRV<sub>H</sub>a, RV<sub>H</sub>b, RV<sub>H</sub>c, RV<sub>H</sub>d, RV<sub>H</sub>e, 又はRV<sub>H</sub>fとして示されるアミノ酸配列を有する、請求項34に記載の再構成ヒトH鎖V領域をコードするDNA。

【請求項38】 (1) ヒトL鎖C領域；並びに(2) ヒトFR、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のCDRを含んで成るL鎖V領域；を含んで成るヒトIL-6Rに対する抗体の再構成ヒトL鎖をコードするDNA。

【請求項39】 (1) ヒトH鎖C領域；並びに(2) ヒトFR、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のCDRを含んで成るH鎖V領域；を

含んで成る、ヒトIL-6Rに対する抗体の再構成ヒトH鎖をコードするDNA。

【請求項40】 請求項22, 24, 26, 28, 31, 34, 38及び39のいずれか1項に記載のDNAを含んで成るベクター。

【請求項41】 請求項22, 24, 26, 28, 31, 34, 38及び39のいずれか1項に記載のDNAを含んで成るベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項42】 配列番号57に示されるヌクレオチド配列を有する請求項31に記載のDNA。

【請求項43】 配列番号56に示されるヌクレオチド配列を有する請求項34に記載のDNA。

【請求項44】 前記L鎖V領域が配列番号57に示されるヌクレオチド配列を有する請求項38に記載のDNA。

【請求項45】 前記H鎖V領域が配列番号56に示されるヌクレオチド配列を有する請求項39に記載のDNA。

【請求項46】 (1) ヒトL鎖C領域；及び

(2) ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域；を含んで成る、ヒトIL-6Rに対する抗体のキメラL鎖をコードするDNA。

【請求項47】 (1) ヒトH鎖C領域；及び

(2) ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域を含んで成る、ヒトIL-6Rに対する抗体のキメラH鎖をコードするDNA。

【請求項48】 ヒトIL-6Rに対するキメラ抗体の製造方法であって、

請求項46に記載のDNAを含んで成る発現ベクター及び請求項47に記載のDNAを含んで成る発現ベクターにより同時形質転換された宿主細胞を培養し、そして目的とする抗体を回収する、段階を含んで成る方法。

【請求項49】 ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体の製造方法であって、

請求項38に記載のDNAを含んで成る発現ベクター及び請求項39に記載のDNAを含んで成る発現ベクターにより同時形質転換された宿主細胞を培養し、そして目的とする抗体を回収する、ことを含んで成る方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ヒトインターロイキン-6受容体(IL-6R)に対するマウスモノクローナル抗体の可変領域(V領域)、ヒトIL-6Rに対するヒト/マウスキメラ抗体、ヒトライト鎖(L鎖)V領域及びヒトヘビー鎖(H鎖)V領域の相補性決定領域(CDR)がヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のCDRにより置き換えられている再構成(reshaped)ヒト抗体に関する。

【0002】 本発明はさらに、上記の抗体又はその部分

をコードするDNAを提供する。本発明はさらに、前記DNAを含んで成るベクター、特に発現ベクター、並びに該ベクターにより形質転換された宿主に関する。本発明はさらに、ヒトIL-6Rに対するキメラ抗体の製造方法、及びヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体の製造方法を提供する。

#### 【0003】

【従来の技術】 インターロイキン-6 (IL-6) は一連の細胞により生産される多機能サイトカインである。このものは免疫応答、急性期反応及び造血を調節し、そして宿主防御機構において中心的役割を演ずる。このものは広範な組織に作用して、標的細胞の性質に応じて成長誘導効果、成長阻害効果及び分化誘導効果を発揮する。

【0004】 IL-6に対する特異的レセプター (IL-6R) は、IL-6の多機能性に従ってリンパ系細胞及び非リンパ系細胞上で発現される。IL-6遺伝子の異常発現が種々の疾患、特に自己免疫疾患、メサンジウム細胞増殖性糸球体腎炎、及び形質細胞腫/骨髄腫の発病に関与することが示唆されている (Hiranoら、*Immunol. Today*, 11, 443-449, 1990の総説を参照のこと)。

【0005】 ヒト骨髄腫細胞はIL-6を生産しそしてIL-6Rを発現することが観察される。実験において、IL-6に対する抗体が骨髄腫細胞の試験管内での増殖を阻害し、そしてそれ故にヒト骨髄腫の発癌においてオートクリン調節ループが機能していることが示された (Kawanoら、*Nature*, 332, 83, 1988)。

【0006】 IL-6Rは種々の動物細胞の表面に存在し、そしてIL-6に特異的に結合し、そして細胞表面上のIL-6R分子の数が報告されている (Tagaら、*J. Exp. Med.* 196, 967, 1987)。さらに、ヒトIL-6RをコードするcDNAがクローン化され、そしてIL-6Rの一次構造が報告されている (Yamasakiら、*Science*, 241, 825, 1988)。

【0007】 マウスのモノクローナル抗体はヒトにおいて高度に免疫原性 (「抗原性」という場合もある) があり、そしてこの理由のため、ヒトにおけるそれらの療法的価値は制限される。ヒトにおけるマウス抗体の半減期は比較的短い。さらに、ヒト抗マウス抗体は、予定された効果を妨害するのみならず、患者における不都合なアレルギー応答の危険をもたらす免疫応答を惹起することなくして頻回投与することはできない。

【0008】 これらの問題を解決するため、ヒト型化 (humanized) 抗体の製造方法が開発された。マウス抗体は2つの方法でヒト型化することができる。より簡単な方法は、可変領域がもとのマウスモノクローナル抗体に由来しそして定常領域が適当なヒト抗体に由

来するキメラ抗体を作製する方法である。得られるキメラ抗体はもとのマウス抗体の完全な可変領域を含有し、そしてもとのマウス抗体と同一の特異性をもって抗原に結合することを期待することができる。

【0009】 さらに、キメラ抗体ではヒト以外に由来する蛋白質配列の比率が実質的に減少しており、そしてそれ故にもとのマウス抗体に比べて免疫原性が低いと予想される。キメラ抗体は抗原によく結合しそして免疫原性が低い、マウス可変領域に対する免疫応答がなお生ずる可能性がある (LoBuglioら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 4220-4224, 1989)。

【0010】 マウス抗体をヒト型化するための第二の方法は一層複雑であるが、しかしマウス抗体の潜在的な免疫原性をさらに大幅に低下させるものである。この方法においては、マウス抗体の可変領域からの相補性決定領域 (complementarity determining region; CDR) をヒト可変領域に移植して「再構成」 (reshaped) ヒト可変領域を作製する。

【0011】 次に、これらの再構成ヒト可変領域をヒト定常領域に連結する。最終的に再構成されたヒト型抗体のヒト以外の蛋白質配列に由来する部分はCDRと極く一部のフレームワーク (FR) のみである。CDRは超可変蛋白質配列により構成されている。これらは種特異的配列を示さない。これらの理由のため、マウスCDRを担持する再構成ヒト抗体はもはやヒトCDRを含有する天然ヒト抗体より強い免疫原性を有しないはずである。

#### 【0012】

【発明が解決しようとする課題】 前記のごとく、再構成ヒト抗体は療法目的のために有用であると予想されるが、ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体は知られていない。さらに、再構成ヒト抗体の製造方法であって任意の特定の抗体に普遍的に適用し得る方法は存在しない。従って、特定の抗原に対する十分に活性な再構成ヒト抗体を作製するためには種々の工夫が必要である。

【0013】 ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体、すなわちPM1およびMT18は作製されており (特願平2-189420)、そして本発明者らはヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体AUK12-20、AUK64-7及びAUK146-15を調製しているが、本発明者らはヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体の作製を示唆する文献を知らない。

【0014】 さらに、ヒト骨髄腫細胞株が移植されたヌードマウスに、ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体が注射された時腫瘍の増殖が顕著に阻害されることを、本発明者らは見出した。このことは、骨髄腫の治療のための療法剤として抗ヒトIL-6R抗体が有用であることを示唆している。従って本発明はヒトIL

ー6Rに対する、免疫原性の低い抗体を提供しようとするものである。

#### 【0015】

【課題を解決するための手段】従って、本発明はヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体を提供する。本発明はまた、該再構成ヒト抗体の作製の過程で有用なヒト/マウスキメラ抗体を提供する。本発明はさらに、再構成ヒト抗体の部分、並びに再構成ヒト抗体及びその部分並びにキメラ抗体の製造のための発現系を提供する。さらに具体的には、本発明は、ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域；並びにヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域を提供する。

【0016】本発明はさらに、(1)ヒトL鎖C領域、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域を含んで成るL鎖；並びに(2)ヒトH鎖C領域、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域を含んで成るH鎖；を含んで成る、ヒトIL-6Rに対するキメラ抗体を提供する。本発明はさらに、ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDR；並びにヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDRを提供する。

【0017】本発明はさらに、(1)ヒトL鎖V領域のフレームワーク領域(FR)、及び(2)ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDR、を含んで成る、ヒトIL-6Rに対する抗体の再構成ヒトL鎖V領域；並びに(1)ヒトH鎖V領域のFR、及び(2)ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDR、を含んで成る、ヒトIL-6Rに対する抗体の再構成ヒトH鎖V領域を提供する。

【0018】本発明はさらに、(1)ヒトL鎖C領域、並びに(2)ヒトFR、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のCDRを含んで成るL鎖V領域、を含んで成る、ヒトIL-6Rに対する抗体の再構成ヒトL鎖；並びに(1)ヒトH鎖C領域、並びに(2)ヒトFR、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のCDRを含んで成るH鎖V領域、を含んで成る、ヒトIL-6Rに対する抗体の再構成ヒトH鎖を提供する。

【0019】本発明はさらにまた、

(A) (1)ヒトL鎖C領域、並びに(2)ヒトL鎖FR、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖CDRを含んで成るL鎖；並びに

(B) (1)ヒトH鎖C領域、並びに(2)ヒトH鎖FR、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖CDRを含んで成るH鎖；を含んで成る、ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体を提供する。本発明はまた、前記種々の抗体構成ポリペプチド、又はその

部分をコードするDNAに関する。

【0020】本発明はまた、上記DNAを含んで成るベクター、例えば発現ベクターに対する。本発明はさらに、上記ベクターにより形質転換された宿主を提供する。本発明はさらにまた、ヒトIL-6Rに対するキメラ抗体の製造方法、及びヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体の製造方法を提供する。

#### 【0021】

【具体的な説明】

#### 10 マウスV領域をコードするDNAのクローニング

さらに詳しくは、ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNAをクローン化するためには、遺伝子源として、ヒトIL-6Rに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを作製することが必要である。このようなハイブリドーマとして、特願平2-189420号明細書にはモノクローナル抗体PM1を生産するマウスハイブリドーマPM1及び該抗体の性質が記載されている。

【0022】本明細書の参考例2にハイブリドーマPM1の作製方法を記載する。本発明者らは、それぞれがヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマAUK12-20、AUK64-7及びAUK146-15を作製している。これらのハイブリドーマの作製方法は本明細書の参考例3に記載されている。

【0023】マウスモノクローナル抗体の可変領域をコードする目的のDNAをクローン化するためハイブリドーマ細胞を破壊し、そしてChirgwinら、Biochemistry 18, 5294, 1977に記載されている常法により全RNAを得る。次に、この全RNAを用いて、J. W. Larrickら、Biotechnology, 7, 934, 1989に記載されている方法を用いて一本鎖cDNAを合成する。

【0024】次に、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を用いて前記cDNAの有意義な部分の特異的増幅を行う。マウスモノクローナル抗体のカッパ( $\kappa$ )型L鎖V領域の増幅のため、配列番号：1~11に示す11種のオリゴヌクレオチドプライマー(Mouse Kappa Variable; MKV)及び配列番号：12に示すオリゴヌクレオチドプライマー(Mouse Kappa Constant; MKC)をそれぞれ5'-末端プライマー及び3'-末端プライマーとして使用する。

【0025】前記MKVプライマーはマウスカッパ型L鎖リーダー配列をコードするDNA配列とハイブリダイズし、そして前記MKCプライマーはマウスカッパ型L鎖C領域をコードするDNA配列とハイブリダイズする。マウスモノクローナル抗体のH鎖V領域の増幅のため、配列番号：13~22に示す10種のオリゴヌクレオチドプライマー(Mouse Heavy Vari

able; MHV) 及び配列番号: 23に示すオリゴヌクレオチドプライマー (Mouse Heavy Constant; MHC) をそれぞれ5'-末端プライマー及び3'-末端プライマーとして使用する。

【0026】なお、5'-末端プライマーはその5'-末端近傍に制限酵素SalI切断部位を提供する配列GTCGACを含有し、そして3'-末端プライマーはその5'-末端近傍に制限酵素XmaI切断部位を提供するヌクレオチド配列CCCGGGを含有する。これらの制限酵素切断部位は可変領域をコードする目的のDNA断片をクローニングベクターにサブクローニングするために用いられる。

【0027】次に増幅生成物を制限酵素SalI及びXmaIで切断させて、マウスモノクローナル抗体の目的とする可変領域をコードするDNA断片を得る。他方、プラスミドpUC19のごとき適当なクローニングベクターを同じ制限酵素SalI及びXmaIにより切断させ、このpUC19に前記DNA断片を連結することにより、マウスモノクローナル抗体の目的とする可変領域をコードするDNA断片を含むプラスミドを得る。クローン化されたDNAの配列決定は任意の常法に従って行うことができる。目的とするDNAのクローン化及びその配列決定を実施例1〜3に具体的に記載する。

#### 【0028】相補性決定領域 (CDR)

本発明はさらに、本発明の各V領域の超可変又は相補性決定領域 (CDR) を提供する。L鎖及びH鎖の各対のV領域は抗原結合部位を形成する。L鎖及びH鎖上のこの領域は同様の全般的構造を有しそして各領域は配列の比較的保存された4個のフレームワーク領域を含み、それらは3個の超可変領域又はCDRにより連結されている (Kabat, E. A. ら, 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」, US Dept. Health and Human Services 1983)。

【0029】前記4個のフレームワーク領域 (FR) の多くの部分は $\beta$ -シート構造をとり、CDRはループを形成する。CDRはある場合には $\beta$ -シート構造の一部を形成することもある。CDRはFRによって非常に近い位置に保持され、そして他の領域のCDRと共に抗原結合部位の形成に寄与する。

【0030】本発明は、ヒト型化抗体の素材として有用なこれらのCDR、及びそれをコードするDNAをも提供する。これらのCDR領域は、V領域の既知アミノ酸配列と照合することによって、Kabat, E. A. ら, 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」の経験則から見出すことができ、実施例4において具体的に説明する。

#### 【0031】キメラ抗体の作製

ヒトIL-6Rに対する抗体の再構成ヒトV領域を設計するに先立って、使用するCDRが実際に抗原結合領域を形成することを確かめる必要がある。この目的のた

め、キメラ抗体を作製した。さらに実施例1及び2に記載される4種類のモノクローナル抗体のクローン化されたDNAのヌクレオチド配列から推定されるマウス抗ヒトIL-6R抗体のアミノ酸配列を相互に、及び既知のマウス及びヒトの抗体のV領域と比較した。

【0032】4種類のモノクローナル抗体のそれぞれについて、1セットの典型的な機能的マウスL及びH鎖V領域がクローニングされた。しかしながら、4種類すべてのマウス抗ヒトIL-6R抗体は比較的異なるV領域を有していた。4種類の抗体は相互に単に微小な相違ではなかった。クローン化されたマウスV領域を用いて4種類のキメラ抗ヒトIL-6R抗体を作製した。

【0033】キメラ抗体を作製するための基本的な方法は、PCRクローン化cDNAに見られるようなマウスリーダー配列及びV領域配列を、哺乳類細胞発現ベクター中にすでに存在するヒトC領域をコードする配列に連結することを含んで成る。前記4種類のモノクローナル抗体の内、モノクローナル抗体AUK12-20からのキメラ抗体の作製を実施例5に記載する。

【0034】モノクローナル抗体PM-1からのキメラ抗体の作製を実施例6に記載する。マウスPM-1 $\kappa$ L鎖リーダー領域及びV領域をコードするcDNAを、ヒトL鎖C領域をコードするヒトゲノムDNAを含有する発現ベクターにPCR法を用いてクローン化した。マウスPM-1抗体 (単に「PM-1抗体」又は「PM」という場合もある) のH鎖リーダー及びV領域をコードするcDNAを、ヒト $\gamma$ -1C領域をコードするゲノムDNAを含有する発現ベクターにPCR法を用いてサブクローン化した。

【0035】特に設計されたPCRプライマーを用いて、マウスPM-1のV領域をコードするcDNAをそれらの5'-及び3'-末端において適当な塩基配列を導入して (1) それらが発現ベクターに容易に挿入されるように、且つ (2) それらが該発現ベクター中で適切に機能するようにした。次に、これらのプライマーを用いてPCRにより増幅して得たマウスPM-1のV領域を、所望のヒトC領域をすでに含有するHCMV発現ベクター (図1) に挿入した。これらのベクターは、種々の哺乳類細胞系における遺伝子操作された抗体の一過性 (transient) 発現又は安定な発現のために適当である。

【0036】マウスPM-1抗体中に存在するV領域と同じV領域を有するキメラPM-1抗体 (バージョンa) の作製に加えて、キメラPM-1抗体の第二のバージョン (バージョンb) を作製した。キメラPM-1抗体 (バージョンb) においては、L鎖V領域中の位置107のアミノ酸がアスパラギンからリジンに変えられている。マウスPM-1抗体からのL鎖V領域と他のマウスL鎖V領域との比較において、位置107におけるアルギニンの存在は異常であることが注目された。

【0037】マウス $\kappa$ L鎖V領域においては、位置107の最も典型的なアミノ酸はリジンである。マウスPM-1抗体のL鎖V領域中の位置107に非典型的なアミノ酸であるアルギニンを有することの重要性を評価するため、位置107を典型的なアミノ酸であるリジンに変えた。この変更は、PCR-変異誘発法(M. Kamma nら、Nuc l. A c i d s R e s. (1987) 17:5404)を用いてL鎖V領域をコードするDNA配列中に必要な変更を行うことにより達成された。

【0038】キメラPM-1抗体バージョン(a)はヒトIL-6Rに結合する活性を示した。キメラPM-1抗体バージョン(b)もバージョン(a)と同様にヒトIL-6Rに結合する。同様に、他の2種類のモノクローナル抗体AUK64-7及びAUK146-15からキメラ抗体を作製した。4種類すべてのキメラ抗体はヒトIL-6Rによく結合し、機能的測定において、正しいマウスV領域がクローン化されそして配列が決定されていたことが示された。

【0039】4種類のマウス抗ヒトIL-6R抗体から、ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体の設計及び作製のための第一の候補としてマウスPM-1抗体を選択した。マウスPM-1抗体の選択は主として、ヌードマウスに移植されたヒト骨髓腫細胞に対するマウス抗ヒトIL-6R抗体及びキメラ化抗体の効果を研究して得られた結果に基く。4種類のマウス抗ヒトIL-6R抗体の内、PM-1抗体が最も強い抗腫瘍細胞活性を示した。又、キメラ化PM-1抗体はキメラ化AUK12-20抗体よりも強い抗腫瘍性を示した。

【0040】マウスモノクローナル抗体PM-1のV領域と既知のマウス及びヒトの抗体のV領域との比較

マウスモノクローナル抗体のCDRがヒトモノクローナル抗体に移植されている再構成ヒト抗体を作製するためには、マウスモノクローナル抗体のFRとヒトモノクローナル抗体のFRとの間に高い相同性が存在することが望ましい。従って、マウスPM-1抗体のL鎖及びH鎖のV領域を、OWL(or Leeds) database of protein sequencesに見出されるすべての既知マウス及びヒトのV領域と比較した。

【0041】マウス抗体のV領域に関しては、PM-1抗体のL鎖V領域はマウス抗体musigkcko(C hen, H. T. ら、J. Biol. Chem. (1987) 262:13579-13583)のL鎖V領域

と最も類似しており、93.5%の同一性(identity)が存在した。PM-1抗体のH鎖V領域はマウス抗体musigvhr2(F. J. Grantら、Nuc l. A c i d s R e s. (1987) 15:5496)のH鎖V領域に最も類似しており、84.0%の同一性が存在した。

【0042】マウスPM-1のV領域は既知マウスV領域に高比率の同一性を示し、マウスPM-1のV領域が典型的なマウスV領域であることが示される。このことはさらに、クローン化されたDNA配列が正しいという間接的な証明を与える。一般に、H鎖V領域間に比べてL鎖V領域間の方がより高い比率の同一性が存在する。これはおそらく、H鎖V領域に比べてL鎖V領域において一般的に観察されるより少ない量の多様性のためであろう。

【0043】ヒト抗体のV領域に関しては、マウスPM-1抗体のL鎖V領域は、REIとも称されるヒト抗体klhure(W. Palmら、Physiol. Chem. (1975) 356:167-191)のL鎖V領域に最も類似しており、72.2%の同一性が存在する。PM-1抗体のH鎖V領域は、ヒト抗体humighvap(VAP)(H. W. Schroederら、Science (1987) 238:791-793)に最も類似しており、71.8%の同一性が存在する。

【0044】マウスPM-1抗体からの再構成抗体をいかに設計するかを考えるためにヒトV領域との比較が最も重要である。ヒトV領域への同一性の比率はマウスV領域への同一性の比率より低い。これはマウスPM-1抗体のV領域がマウスV領域に類似しており、そしてヒトV領域には類似していないことの間接的な証明である。この証明にまた、ヒト患者における免疫原性の問題を解決するためにマウスPM-1のV領域をヒト型化する(humanize)ことが最善であることを示す。

【0045】マウスPM-1抗体のV領域をさらに、E. A. Kabatら、(1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Forth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Officeにより定義される、ヒトV領域の異なるサブグループについてのコンセンサス配列と比較した。V領域のFR間で比較を行った。その結果を表1に示す。

【0046】

【表1】



13

14

マウスPM-1のV領域のFRと、異なる種々のサブグループのヒトV

領域のコンセンサス配列<sup>(1)</sup>のFRとの間の同一性(%)

#### A. L鎖V領域におけるFR

HSGI	HSGII	HSGIII	HSGIV
70.1	53.3	60.7	59.8

#### B. H鎖V領域におけるFR

HSGI	HSGII	HSGIII
44.1	52.9	49.2

(1) コンセンサス配列はKabatら(1987)に記載されている

【0047】マウスPM-1のL鎖V領域のFRはヒトL鎖V領域のサブグループI(HSGI)のコンセンサス配列からのFRに最も類似しており、70.1%の同一性が存在する。マウスPM-1のH鎖V領域のFRはヒトH鎖V領域のサブグループII(HSGII)のコンセンサス配列からのFRに最も類似しており、52.9%の同一性が存在する。これらの結果は、既知のヒト抗体との比較から得られた結果を支持している。ヒトREI中のL鎖V領域はヒトL鎖V領域のサブグループIに属し、そしてヒトVAP中のH鎖V領域はヒトH鎖V領域のサブグループIIに属する。

【0048】ヒト抗体中のV領域とのこれらの比較から、再構成ヒトPM-1V領域の設計の基礎となるヒトV領域を選択することが可能である。再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の設計のためにはサブグループI(SGI)に属するヒトL鎖V領域を使用し、そして再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域の設計のためにはサブグループII(SGII)に属するヒト抗体H鎖V領域を用いるのが最善であろう。

【0049】再構成ヒトPM-1抗体V領域の設計再構成ヒトPM-1抗体V領域の設計における第一段階は、設計の基礎となるヒト抗体V領域を選択することであった。マウスPM-1抗体L鎖V領域中のFRは、サブグループIに属するヒト抗体L鎖V領域中のFRに最も類似していた(表1)。前記のごとく、マウスPM-1抗体のL鎖V領域と既知ヒト抗体L鎖V領域との比較において、それはヒトL鎖V領域のサブグループIの1構成員であるヒトL鎖V領域REIに最も類似していた。従って、再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の設計においてREIからのFRを使用した。また、再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の作製のための出発材料としてREIのFRを使用した。

【0050】REIに基くこれらのヒトFR中には、もとのヒトREIに比べて5個の相違が存在する(kabatら、1987、によれば位置39、71、104、105及び107;表2を参照のこと)。FR4中の3

個の変化(位置104、105及び107)は他のヒトκL鎖からのJ領域に基いており、そしてそれ故にヒトからの逸脱を成すものではない(L. Riechmannら、Nature(1988)322:21-25)。位置39及び71における2個の変化はラットCAMPATH-1のL鎖V領域のFR中に存在するアミノ酸にもどる変化であった(Riechmannら、1988)。

【0051】再構成ヒトMI-1抗体L鎖V領域の2つのバージョンを設計した。第一のバージョン(バージョン「a」)においては、ヒトFRは再構成ヒトCAMPATH-1H中に存在するREIに基くFR(Riechmannら、1988)と同一であり、そしてマウスCDRはマウスPM-1のL鎖V領域中のCDRと同じであった。第二のバージョン(バージョン「b」)はバージョン「a」に基き、ヒトFR3中の位置71におけるアミノ酸1個のみを異にする。

【0052】C. Chothiaら、J. Mol. Biol. (1987)196:901-917により定義されるように、残基71はL鎖V領域のCDR1の標準的(canonical)構造の部分である。この位置のアミノ酸はL鎖V領域のCDR1ループの構造に直接影響すると予想され、そしてそれ故に抗体結合に大きく影響するであろう。マウスPM-1のL鎖V領域において、位置71はチロシンである。

【0053】再構成ヒトPM-1抗体のL鎖V領域のバージョン「a」の設計に使用した修飾されたREIのFRにおいては位置71はフェニルアラニンであった。再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域のバージョン「b」においては、位置71のフェニルアラニンがマウスPM-1抗体L鎖V領域中に見出されるようにチロシンに変えられている。表2は、マウスPM-1抗体のL鎖V領域、再構成ヒトCAMPATH-1H抗体中での使用のために修飾されたREIのFR(Riechmannら、1988)及び再構成ヒトPM-1抗体のL鎖V領域の2種類のバージョンの、それぞれのアミノ酸配列を

示す。

【0054】

\*【表2】

	FR1												CDR1			
	1						2						3			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4
V <sub>L</sub> PM-1	DI	Q	M	T	Q	T	T	S	S	L	S	A	S	L	G	D
REI	DI	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D
RV <sub>L</sub> a	DI	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D
RV <sub>L</sub> b	-----												-----			

	FR2								CDR2					
	4				5									
	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6
V <sub>L</sub> PM-1	W	Y	Q	Q	K	P	D	G	T	I	K	L	L	I
REI	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I
RV <sub>L</sub> a	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I
RV <sub>L</sub> b	-----													

	FR3												CDR3			
	6				7				8				9			
	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	1	2	3	4
V <sub>L</sub> PM-1	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	Y	S	L	T
REI	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	T	I
RV <sub>L</sub> a	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	T	I
RV <sub>L</sub> b	-----												-----			

	FR4						
	10						
	8	9	10	11	12	13	14
V <sub>L</sub> PM-1	F	G	G	G	T	K	L
REI	F	G	Q	G	T	K	V
RV <sub>L</sub> a	F	G	Q	G	T	K	V
RV <sub>L</sub> b	-----						

【0055】注：REIのFRは再構成ヒトCAMPATH-1H抗体中に見出されるものである（Riechmannら、1988）。REIのFR中の5個の下線を付したアミノ酸はヒトREIのアミノ酸配列（Plamら、1975；O. Eppら、Biochemist ry（1975）14：4943-4952）から異なるアミノ酸である。

【0056】マウスPM-1抗体のH鎖V領域中のFRはサブグループIIに属するヒトH鎖V領域に最も類似し

ている（表1）。前記のごとく、マウスPM-1抗体のH鎖V領域と既知のヒトH鎖V領域との比較において、これはヒトH鎖V領域のサブグループIIの1構成員であるヒトH鎖V領域VAPに最も類似していた。ヒトH鎖V領域のサブグループIIの他の構成員であるヒトH鎖V領域NEWを、再構成ヒトPM-1抗体のH鎖V領域の作製のための出発材料として、及び再構成ヒトPM-1抗体のH鎖V領域の設計のための基礎として用いた。

【0057】再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域の6種

17

類のバージョンを設計した。6種類のバージョンのすべてにおいて、ヒトFRは再構成D1.3中に存在するNEWFRに基いており、そしてマウスCDRはマウスPM-1抗体H鎖V領域中のCDRと同じである。ヒトFR中の7個のアミノ酸残基（位置1, 27, 28, 29, 30, 48及び71；表3参照）は抗原結合に不都合な影響を与える可能性を有するものと同定されている。

【0058】マウスPM-1抗体のV領域のモデルにおいて、H鎖V領域中の残基1はCDRループの近くに位置する表面残基である。残基27, 28, 29, 及び30は、C. Chothiaら、Nature (1989) 34:877-882により推定されるようにH鎖V領域のCDR1の標準的 (canonical) 構造の部分であり、そして／又はH鎖V領域の第一構造ループ\*

10

18

\*ブの部分で構成するマウスPM-1抗体V領域のモデルにおいて観察される (Chothiaら、1987)。

【0059】残基48はマウスPM-1抗体のV領域のモデルにおいて埋った (buried) 残基として観察された。埋った (buried) 残基の変化はV領域及びその抗原結合部位の全体構造を破壊する可能性がある。残基71は、Chothiaら (1989) により予想されるようにH鎖V領域のCDR2の標準 (canonical) 構造の部分である。再構成ヒトPM-1抗体の6種類のバージョンはヒトNEWのFR中のこれら7つの位置のアミノ酸の変化の異なる組合わせを含む (表3及び表4を参照のこと)。

【0060】

【表3】

FR1												CDR1				
1				2				3								
123456789012345678901234567890												123455				
												A				
V <sub>H</sub> PM-1	DVQLQESGPVLVKPSQSLSLTCTVTGYSIT												SDHAWS			
NEW	QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVSGSTFS															
RV <sub>H</sub> a	QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVSGYTF <u>T</u>												SDHAWS			
RV <sub>H</sub> b	-----Y--T												-----			
RV <sub>H</sub> c	D-----Y--T												-----			
RV <sub>H</sub> d	-----Y--T												-----			
RV <sub>H</sub> e	D-----Y--T												-----			
RV <sub>H</sub> f	-----YSIT												-----			

	FR2												CDR2																							
	4												5	6																						
	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5						
V <sub>H</sub> PM-1	W	I	R	Q	F	P	G	N	K	L	E	W	M	G						Y	I	S	-	Y	S	G	I	T	T	Y	N	P	S	L	K	S
NEW	W	V	R	Q	P	P	G	R	G	L	E	W	I	G						Y	I	S	-	Y	S	G	I	T	T	Y	N	P	S	L	K	S
RV <sub>H</sub> a	W	V	R	Q	P	P	G	R	G	L	E	W	I	G						Y	I	S	-	Y	S	G	I	T	T	Y	N	P	S	L	K	S
RV <sub>H</sub> b	-----												-----																							
RV <sub>H</sub> c	-----												-----																							
RV <sub>H</sub> d	-----M-												-----																							
RV <sub>H</sub> e	-----M-												-----																							
RV <sub>H</sub> f	-----												-----																							

【0061】

【表4】

19

20

		FR3	
	7	8	9
	67890123456789012222345678901234		
		ABC	
V <sub>H</sub> PH-1	RISITRDTSKNQFFLQLNSVTTGDTSTYYCAR		
NEW	RVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAR		
RV <sub>H</sub> a	RVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAR		
RV <sub>H</sub> b	-----R-----		
RV <sub>H</sub> c	-----R-----		
RV <sub>H</sub> d	-----R-----		
	-----R-----		
RV <sub>H</sub> e			
RV <sub>H</sub> f	-----R-----		

	CDR3	FR4
	10	11
	5678900012	34567890123
	AB	
V <sub>H</sub> PM-1	SLARTTAMDY	WGQGTSVTVSS
NEW		WGQGS�VTVSS
RV <sub>H</sub> a	SLARTTAMDY	WGQGS�VTVSS
RV <sub>H</sub> b	-----	-----
RV <sub>H</sub> c	-----	-----
RV <sub>H</sub> e	-----	-----
RV <sub>H</sub> e	-----	-----
RV <sub>H</sub> f	-----	-----

【0062】注：NEWのFRには再構成ヒトCAMPATH-1H抗体の第一バージョン（Riechmanら、1988）中に見出されるものである。

#### 再構成ヒトPM-1抗体V領域の作製

再構成ヒトPM-1抗体L鎖及びH鎖V領域のそれぞれの第一バージョンを新規なPCR利用法を用いて作製した。要約すれば、適当なヒトFRをすでに含有する再構成ヒトV領域をコードするプラスミドをPCRプライマーを用いて修飾し、出発ヒトV領域中に存在するCDR

【0063】再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の作製のための出発材料は、再構成ヒトD1.3L鎖V領域を含有するプラスミドDNAであった。この再構成ヒトD1.3L鎖V領域はヒトL鎖V領域REI中に存在するFRに基いて作製された。再構成ヒトPM-1H鎖V領域の作製のための出発材料は再構成ヒトD1.3H鎖V領域であった。この再構成ヒトD1.3H鎖V領域はヒトH鎖V領域NEW（W. Verhoeyenら、Science（1988）239：1534-1536）

中に存在するFRに基いて作製された。

【0064】所望のヒトFRを含有する出発プラスミドDNAを選択した後、マウスD1.4CDRに代るマウスPM-1抗体CDRの置換を可能にするようにPCRプライマーを設計しそして合成した。各再構成ヒトPM-1抗体V領域につき、3種類のプライマーはマウスPM-1抗体CDRをコードするDNA配列を含有し、そして2種類のプライマーは再構成ヒトV領域をコードする全体DNA配列を挟むように設計されている。

【0065】一連のPCR反応における5種類のPCRプライマーの使用が、出発再構成ヒトV領域中に存在するヒトFR及びマウスPM-1抗体V領域中に存在するCDRから成る（実施例7、並びに図7及び図8を参照のこと）。PCR生成物をクローン化し、そして配列決定して、再構成ヒトPM-1抗体L鎖及びH鎖V領域のバージョン「a」の全体DNA配列が正しいアミノ酸配列をコードしていることを確認した。再構成ヒトPM-1L鎖V領域バージョン「a」の配列を配列番号55に示す。

【0066】再構成ヒトPM-1抗体V領域の他のバージョンは、公表されているPCR-変異誘発法(Kammanら、1989)にわずかな変更を加えた方法を用いて作製した。再構成ヒトPM-1抗体V領域の設計に関して記載したように、再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の1つの追加のバージョン(バージョン「b」)を作製し、そして再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域の5種類の追加のバージョン(バージョン「b」、「c」、「d」、「e」、及び「f」)を作製した。

【0067】これらの追加のバージョンは、第一バージョンからの一連の微細な変化を含む。アミノ酸配列のこれらの微細な変化はPCR変異誘発を用いてDNA配列の微細な変更を行うことにより達成された。DNA配列に必要な変化を導入するPCRプライマーが設計された。一連のPCR反応に続き、PCR生成物をクローン化し、そして配列決定してDNA配列中の変化が計画通りに起っていることを確認した。再構成ヒトPM-1H鎖V領域バージョン「f」の配列を配列番号54に示す。

【0068】再構成ヒトPM-1抗体V領域の種々のバージョンのDNA配列を配列決定により確認した後、再構成ヒトPM-1抗体V領域を、ヒトC領域をすでに含有する哺乳類細胞発現ベクターにサブクローニングした。再構成ヒトPM-1抗体V鎖L領域をヒトL鎖C領域をコードするDNA配列に連結した。再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域をヒトγ-1C領域をコードするDNA配列に連結した。

【0069】再構成ヒトPM-1抗体のより高レベルの発現を達成するため、図1に示すようなHCMV発現ベクターを修飾して、HCMVプロモーター・エンハンサー領域をヒトエロンゲーションファクター(human elongation factor; HFF-1α)プロモーター・エンハンサーにより置き換えた(図15を参照のこと)。

【0070】次に再構成L鎖V領域バージョン(a)と、H鎖V領域バージョン(a)～(f)のすべての組合せをヒトIL-6Rへの結合について試験し、そしてその結果、実施例11に詳細に記載するように、L鎖バージョン(a)とH鎖バージョン(f)とを含んで成る再構成ヒト抗体がキメラPM-1抗体(a)と同じレベルでIL-6Rに結合する能力を示した。

【0071】発現のレベルを改良するための、再構成ヒトPM-1抗体V領域をコードするDNAの変更  
COS細胞中で生産される再構成ヒトPM-1抗体の発現レベルの検討において、再構成ヒトH鎖の発現が常に、再構成ヒトL鎖又はキメラL鎖もしくはH鎖の発現レベルに比べて約10分の1であることが明らかになった。低レベルの発現を生じさせる問題点は再構成ヒトH鎖V領域にあるようであった。低レベルの発現が低レベルの転写の結果であるか否かを特定するため、再構成ヒ

トPM-1抗体L鎖及びH鎖を発現する各ベクターにより同時形質転換されたCOS細胞からRNAを調製した。

【0072】マウスPM-1抗体V領域のPCRクローニングについて記載したようにして第一本鎖cDNAを合成した。再構成ヒトL鎖又はH鎖V領域をコードするDNA配列の両端挟むように設計されたPCRプライマーを用いて、再構成ヒトL鎖V領域又は再構成H鎖V領域に対応する前記cDNAからPCR生成物を生成せしめた。

【0073】再構成ヒトL鎖V領域について、2種類のPCR生成物が存在し、一方は予想通り408bpの長さを有し、他方はより短い299bpのPCR生成物であった。正しいサイズのPCR生成物はPCR生成物の全生成量の約90%を占め、そして短いPCR生成物は全生成量の約10%を占めた。再構成ヒトH鎖V領域についてもやはり2種類のPCR生成物が存在し、一方は予想通り444bpの長さを有し、そして他方は370bpの長さの短いPCR生成物であった。

【0074】しかしながらこの場合、正しくない短い方のPCR生成物がPCR生成物の全生成量の大部分、すなわち約90%を占めた。正しいサイズのPCR生成物はPCR生成物の全生成量の約10%に過ぎなかった。これらの結果は、再構成ヒトV領域をコードするRNAの幾らかが欠失を含むことを示した。

【0075】どの配列が除去されたかを決定するため、短い方のPCR生成物をクローニングし、そして配列決定した。DNA配列から、L鎖及びH鎖V領域のいずれについてもDNAの特定の部分が欠けていることが明らかになった。除去された配列を挟むDNA配列の検討により、これらの配列はスプライドナー・アクセプター配列のコンセンサス配列(Breathnach, Rら, Ann. Rev. Biochem. (1981) 50:349-383)に相当することが明らかとなった。

【0076】再構成ヒトH鎖の低い発現レベルは、再構成ヒトH鎖V領域の設計が、どちらかと言えば効果的なスプライドナー・アクセプター部位を不注意に形成させたためであると説明された。さらに、再構成ヒトL鎖V領域の設計はどちらかと言えば非効果的なスプライドナー・アクセプター部位を不注意に形成させたようであった。これらのスプライドナー・アクセプター部位を除去するため、ヒトPM-1L鎖及びH鎖V領域のそれぞれバージョン「a」及び「f」をコードするDNA配列のわずかな変更を前記のPCR-変異誘発法を用いて行った。

【0077】低下したレベルの発現の他の可能性ある原因は、再構成ヒトL鎖及びH鎖V領域(配列番号:54及び55)の両者のリーダー配列中のイントロンの存在であると考えられた。これらのイントロンはもともと、

再構成ヒトD1.3のV領域(Verhoevenら、1988)の作製において使用されたマウス $\mu$ H鎖リーダー配列(M. S. Neubergerら、Nature(1985)314:268-270)に由来する。

【0078】再構成ヒトD1.3は、マウス免疫グロブリンプロモーターを用いる哺乳類細胞ベクターにおいて発現されたためマウスリーダーイントロンの存在が重要であった。リーダーイントロンは免疫グロブリンプロモーターからの発現のためには重要であるが、しかしHCMVのごときウィルスプロモーターからの発現のためには重要でない(M. S. Neubergerら、Nucleic Acids Res.(1988)16:6713-6724)配列を含有している。再構成ヒトPM-1L鎖及びH鎖が免疫グロブリンプロモーター以外のプロモーターを用いるベクターにおいて発現される場合、リーダー配列中のイントロンは、再構成ヒトV領域をコードするcDNAのPCRクローニングにより除去された(実施例12を参照のこと)。

【0079】低下した発現レベルの他の可能性ある原因は、再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域とヒト $\gamma$ -1C領域との間のイントロン内の約190bpの非機能的DNAの存在であると考えられた。再構成ヒトBI-8H鎖V領域(P. T. Jonesら、Nature(1986)321:522-525)にもともと由来するDNA配列から再構成ヒトPM-1H鎖V領域を作製した。

【0080】この最初の再構成ヒトV領域はマウスNPのH鎖V領域(M. S. Neubergerら、Nature; M. S. Neubergerら、EMBO J.(1983)2:1373-1378)から作製された。再構成ヒトH鎖V領域と、発現ベクターに再構成ヒトV領域を連結するためのBamHI部位との間のイントロン中に存在する約190bpのこのストレッチは、再構成ヒトV領域をコードするcDNAのPCRクローニングの過程で除去された。

【0081】発現レベルを改良するために変形された再構成ヒトPM-1抗体L鎖及びH鎖V領域の最終バージョンのDNA配列及びアミノ酸配列を配列番号:57及び56に示す。これらのDNA配列は、表2に示した再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域のバージョン「a」、並びに表3及び表4に示した再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域のバージョン「f」をコードする。HEF-1 $\alpha$ 発現ベクター(図15)に挿入された場合、これらのベクターはトランスフェクトされたCOS細胞中で約2 $\mu$ g/mlの抗体を一過性に生産する。

【0082】より多量の再構成ヒトPM-1抗体を安定的に生産させるため、dhfr遺伝子を組み込んだ新しいHEF-1 $\alpha$ 発現ベクターを作製した(実施例10、図11を参照のこと)。欠陥のある(crippled)SV40プロモーターを連結したdhfr遺伝子を、ヒト $\gamma$ -1H鎖を発現するHCMVベクターについ

て記載したのと同様にして、ヒト $\gamma$ -1H鎖を発現するHEF-1 $\alpha$ ベクターに導入した。再構成ヒトPM-1抗体L鎖を発現するHEF-1 $\alpha$ ベクター及び再構成ヒトPM-1抗体H鎖を発現するHEF-1 $\alpha$ -dhfrベクターをCHOdhfr(-)細胞に同時形質転換した。

【0083】安定に形質転換されたCHO細胞系を、ヌクレオシドを含有せず10%のFCS及び500 $\mu$ g/mlのG418を含有するAlpha-Minimum Medium( $\alpha$ -MEM)中で選択した。遺伝子増幅工程に先立って、CHO細胞系は10 $\mu$ g/10<sup>6</sup>細胞/日までの再構成ヒトPM-1抗体を生産することが観察された。

【0084】ヒトIL-6Rに対する本発明のキメラ抗体又は再構成ヒト抗体の製造のために任意の発現系、例えば真核細胞、例えば動物細胞、例えば樹立された哺乳類細胞系、真糸状菌細胞、及び酵母細胞、並びに原核細胞、例えば細菌細胞、例えば大腸菌細胞等を使用することができる。好ましくは、本発明のキメラ抗体又は再構成抗体は哺乳類細胞、例えばCOS細胞又はCHO細胞中で発現される。

【0085】これらの場合、哺乳類細胞での発現のために有用な常用のプロモーターを用いることができる。例えば、ヒト・サイトメガロウイルス前期(human cytomegalovirus immediate early; HCMV)プロモーターを使用するのが好ましい。HCMVプロモーターを含有する発現ベクターの例には、HCMV-V<sub>H</sub>-HC $\gamma$ 1、HCMV-V<sub>L</sub>-HC $\kappa$ 、HCMV-12h-g $\gamma$ 1、HCMV-12 $\kappa$ -g $\kappa$ 等であって、pSV2neoに由来するもの(図1を参照のこと)が含まれる。

【0086】本発明のために有用なプロモーターの他の具体例はヒト・エロンゲーション・ファクター1 $\alpha$ (HEF-1 $\alpha$ )プロモーターである。このプロモーターを含有する発現ベクターにはHEF-12h-g $\gamma$ 1及びHEF-12 $\kappa$ -g $\kappa$ (図8及び図9)、並びにHEF-V<sub>H</sub>-g $\gamma$ 1及びHEF-V<sub>L</sub>-g $\kappa$ (図15)が含まれる。

【0087】宿主細胞系中での遺伝子増幅のため、発現ベクターはさらにdhfr遺伝子を含有することができる。dhfr遺伝子を含有する発現ベクターは例えばDHFR- $\Delta$ E-PMh-g $\gamma$ 1(図10)、DHFR- $\Delta$ E-RVh-PM1-f(図11)等である。

【0088】要約すれば、本発明はまず、ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域及びH鎖V領域、並びに該L鎖V領域をコードするDNA及びH鎖V領域をコードするDNAを提供する。これらは、ヒトIL-6Rに対するヒト/マウスキメラ抗体及び再構成ヒト抗体の作製のために有用である。モノクローナル抗体は、例えばAUK12-20、PM-1、A

UK64-7、及びAUK146-15である。L鎖V領域は例えば配列番号：24、26、28又は30に示すアミノ酸配列を有し、そしてH鎖V領域は例えば配列番号：25、27、29、又は31に示すアミノ酸配列を有する。これらのアミノ酸配列は例えばそれぞれ配列番号：24～31に示すヌクレオチド配列によりコードされている。

【0089】本発明はまた、(1)ヒトL鎖C領域及びマウスL鎖V領域；並びに(2)ヒトH鎖C領域及びマウスH鎖V領域：を含んで成る、ヒトIL-6Rに対するキメラ抗体に関する。マウスL鎖V領域及びマウスH鎖V領域並びにこれらをコードするDNAは前記の通りである。前記ヒトL鎖C領域は任意のヒトL鎖C領域であることができ、そして例えばヒトC<sub>κ</sub>である。前記ヒトH鎖C領域は任意のヒトH鎖C領域であることができ、そして例えばC<sub>γ</sub>1である。

【0090】キメラ抗体の製造のためには2種類の発現ベクター、すなわちエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとでマウスL鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAを含んで成る発現ベクター、並びにエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでマウスH鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAを含んで成る発現ベクターを作製する。次に、これらの発現ベクターにより哺乳類細胞のごとき宿主細胞を同時形質転換し、そして形質転換された細胞をインービトロ又はインービボで培養してキメラ抗体を製造する。

【0091】あるいは、マウスL鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNA並びにマウスH鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAを単一の発現ベクターに導入し、そして該ベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、次にこの形質転換された宿主をインービボ又はインービトロで培養して目的とするキメラ抗体を生産させる。

【0092】本発明はさらに、

(A) (1)ヒトL鎖C領域、及び(2)ヒトL鎖FR、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖CDRを含んで成るL鎖V領域、を含んで成るL鎖；並びに

(B) (1)ヒトH鎖C領域、及び(2)ヒトH鎖FR、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖CDRを含んで成るH鎖V領域、を含んで成るH鎖；を含んで成る、ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体を提供する。

【0093】好ましい態様においては、前記L鎖CDRは配列番号24、26、28及び30のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、該アミノ酸配列の範囲が表6において定義されるアミノ酸配列を有し；前記H鎖CDRは配列番号25、27、29及び31に示されるアミノ酸配列であって該アミノ酸配列の範囲が表6におい

て定義されるアミノ酸配列を有し；前記ヒトL鎖FRがREIに由来するものであり；前記ヒトH鎖FRはNEWに由来するものであり；前記ヒトL鎖C領域はヒトκC領域であり；そして前記ヒトH鎖C領域はヒトγ-1Cである。

【0094】好ましい態様においては、L鎖V領域は表2においてRV<sub>L</sub>aとして示されるアミノ酸配列を有し、H鎖V領域は表3及び表4にRV<sub>H</sub>a、RV<sub>H</sub>b、RV<sub>H</sub>c、RV<sub>H</sub>d、RV<sub>H</sub>e又はRV<sub>H</sub>fとして示されるアミノ酸配列を有する。アミノ酸配列RV<sub>H</sub>fが最も好ましい。

【0095】再構成抗体の製造のためには、2種類の発現ベクター、すなわちエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとに前に定義した再構成ヒトL鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクター、及びエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとに前に定義した再構成ヒトH鎖をコードするDNAを含んで成るもう一つの発現ベクターを作製する。次に、これらの発現ベクターを用いて哺乳類細胞のごとき宿主細胞を同時形質転換し、そしてこの形質転換された細胞をインービボ又はインービトロで培養して再構成ヒト抗体を生産せしめる。

【0096】あるいは、再構成L鎖をコードするDNA及び再構成ヒトH鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに導入し、そしてこのベクターを用いて宿主を形質転換し、次にこの形質転換された宿主細胞をインービボ又はインービトロで培養して目的とする再構成ヒト抗体を生産せしめる。

【0097】

【実施例】次に、本発明を下記の実施例により具体的に説明するが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

#### 実施例1. ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNAのクローン化

ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体の可変領域をコードするDNAを次の様にしてクローン化した。

#### 【0098】1. 全RNAの調製

ハイブリドーマAUK12-20からの全RNAを、Chirgwinら、Biochemistry, 18, 5294 (1979)により記載されている方法に従って調製した。すなわち、2.1×10<sup>8</sup>個のハイブリドーマAUK12-20の細胞を20mlの4Mグアニジンチオシアネート(Fulka)中で完全にホモジナイズさせた。ホモジネートを遠心管中の5.3M塩化セシウム溶液層上に重層し、次にこれをBeckman SW40ローター中で31,000rpmにて20℃で24時間遠心分離することによりRNAを沈殿させた。

【0099】RNA沈殿物を80%エタノールにより洗浄し、そして1mM EDTA及び0.5% SDSを含有

する10mM Tris-HCl (pH7.5) 150 $\mu$ l中に溶解し、そしてそれにProteinase (Boehringer)を0.5mg/mlとなるように添加した後、37℃にて20分間インキュベートした。混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、そしてRNAをエタノールで沈殿させた。次に、RNA沈殿物を1mM EDTAを含有する10mM Tris-HCl (pH7.5) 200 $\mu$ lに溶解した。

#### 【0100】2. 一本鎖cDNAの合成

J. W. Larrickら、Biotechnology, 7, 934 (1989)により記載されている方法に従って一本鎖cDNAを合成するため、前記のようにして調製した全RNAの約5 $\mu$ gを40mM KCl, 6mM MgCl<sub>2</sub>, 10mMジチオスレイトール、0.5mM dATP, 0.5mM dGTP, 0.5mM dCTP, 0.5mM dTTP, 35 $\mu$ M oligo dTプライマー (Amersham), 48ユニットのRAV-2逆転写酵素 (RAV-2: Rous associated virus 2; Amersham) 及び25ユニットのヒト胎盤リボヌクレアーゼ阻害剤 (Amersham)を含有する50mM Tris-HCl (pH8.3) 緩衝液10 $\mu$ lに溶解し、そしてこの反応混合物を37℃にて60分間インキュベートしそして次のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法のために直接使用した。

#### 【0101】3. 抗体可変領域をコードする遺伝子のPCR法による増幅

Thermal Cycler Model PHC-2 (Techne)を用いてPCR法を行った。

#### 【0102】(1) マウスL鎖V領域をコードする遺伝子の増幅

PCR法に使用するプライマーは、配列番号: 1~11に示すMKV (Mouse Kappa Variable) プライマー (マウスカッパ型L鎖リーダー配列とハイブリダイズする) (S. T. Jonesら、Biotechnology, 9, 88, 1991)、及び配列番号: 12に示すMKC (Mouse Kappa Constant) プライマー (マウスカッパ型L鎖C領域とハイブリダイズする) (S. T. Jonesら、Biotechnology, 9, 88, 1991)であった。

【0103】まず、10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl 0.1mM dATP, 0.1mM dGTP, 0.1mM dCTP, 0.1mM dTTP, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5ユニットのDNAポリメラーゼAmpli Taq (Perkin Elmer Cetus), 0.25 $\mu$ MのそれぞれのMKVプライマー、3 $\mu$ MのMKCプライマー及び一本鎖cDNA合成の反応混合物1 $\mu$ lを含有するPCR溶液100 $\mu$ lを94℃の初期温度にて1.5分間そして次に94℃にて1分間、50℃にて1分間及び72℃にて1分間、この

順序で加熱した。この温度サイクルを25回反復した後、反応混合物をさらに72℃にて10分間インキュベートした。

#### 【0104】(2) マウスH鎖V領域をコードするcDNAの増幅

PCRのためのプライマーとして配列番号: 13~22に示すMHV (Mouse Heavy Variable) プライマー1~10 (S. T. Jonesら、Biotechnology, 9, 88, 1991)、及び配列番号: 23に示すMHC (Mouse Heavy Constant) プライマー (S. T. Jonesら、Biotechnology, 9, 88, 1991)を使用した。前記3. (1)においてL鎖V領域遺伝子の増幅について記載したのと同じ方法により増幅を行った。

#### 【0105】4. PCR生成物の精製および断片化

前記のようにしてPCR法により増幅したDNA断片をQIAGEN PCR生成物精製キット (QIAGEN Inc. US)を用いて精製し、そして10mM MgCl<sub>2</sub>及び150mM NaClを含有する100mM Tris-HCl (pH7.6) 中で10ユニットの制限酵素Sal I (GIBCO BRL)を用いて37℃にて3時間消化した。

【0106】この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、そしてDNAをエタノール沈殿により回収した。次に、DNA沈殿物を10ユニットの制限酵素Xma I (New England Biolabs)により37℃にて2時間消化し、そして生ずるDNA断片を、低融点アガロース (FMC Bio. Products, 米国)を用いるアガロースゲル電気泳動により分離した。

【0107】約450bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取りそして65℃にて5分間溶融せしめ、そしてこれと同容積の2mM EDTA及び200mM NaClを含有する20mM Tris-HCl (pH7.5)を加えた。この混合物をフェノール及びクロロホルムにより抽出し、そしてDNA断片をエタノール沈殿により回収し、そして1mM EDTAを含有する10mM Tris-HCl (pH7.5)に溶解した。こうして、マウスカッパ型L鎖可変領域をコードする遺伝子を含んで成るDNA断片、及びマウスH鎖可変領域をコードする遺伝子を含んで成るDNA断片を得た。上記DNA断片はいずれもその5'-末端にSal I接着末端を有しそしてその3'-末端にXma I接着末端を有する。

#### 【0108】5. 連結及び形質転換

上記のようにして調製したマウスカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含んで成るSal I-Xma I DNA断片約0.3 $\mu$ gを、プラスミドpUC19をSal I及びXma Iで消化することにより調製したpUC1



9ベクター約0.1 $\mu$ gと、50mM Tris-HCl (pH7.4), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mMジチオスレイトール、1mMスベルミジン、1mM ATP, 0.1 $\mu$ g/mlのウシ血清アルブミン及び2ユニットT4DNAリガーゼ (New England Biolabs) を含有する反応混合物中で、16℃にて16時間反応させ連結した。

【0109】次に、7 $\mu$ lの上記連結混合物を大腸菌DH5 $\alpha$ のコンピテント細胞200 $\mu$ lに加え、そしてこの細胞を氷上で30分間、42℃にて1分間そして再び氷上で1分間静置した。次いで800 $\mu$ lのSOC培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) を加え、37℃にて1時間インキュベートした後、2 $\times$ YT寒天培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

【0110】この形質転換体を、50 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有する2 $\times$ YT培地5ml中で37℃にて一夜培養し、そしてこの培養物から、アルカリ法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に従ってプラスミドDNAを調製した。

【0111】こうして得られた、ハイブリドーマAUK\*30

\*12-20に由来するマウスカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをp12-k2と命名した。上記の同じ方法に従って、ハイブリドーマAUK12-20に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをSalI-XmaI DNA断片から作成し、そしてp12-h2と命名した。

【0112】実施例2. マウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNAのクローニング

実施例1に記載したのと実質上同じ方法をハイブリドーマPM1, AUK64-7及びAUK146-15に適用して下記のプラスミドを得た：ハイブリドーマPM1由来のカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドpPM-k3；ハイブリドーマPM1由来のH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドpPM-h1；ハイブリドーマAUK64-7由来のカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドp64-k4；ハイブリドーマAUK64-7由来のH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドp64-h2；ハイブリドーマAUK146-15由来のカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドp146-k3；及びハイブリドーマAUK146-15由来のH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドp146-h1。

【0113】なお、上記プラスミドを含有する大腸菌株は、National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limitedに、ブダベスト条約に基づいて、1991年2月11日に寄託され、そして表5に示す受託番号を有する。

【0114】

【表5】

プラスミド	配列番号：	受託番号
p12-k2	24	NCIMB 40367
p12-h2	25	NCIMB 40363
pPM-k3	26	NCIMB 40366
pPM-h1	27	NCIMB 40362
p64-k4	28	NCIMB 40368
p64-h2	29	NCIMB 40364
p146-k3	30	NCIMB 40369
p146-h1	31	NCIMB 40365

【0115】実施例3. DNAの塩基配列の決定  
前記のプラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列を、Sequenase™ Version 2.0キット (U. S. Biochemical Corp、米国) を用いて決定した。まず、前記のようにして得られたブ

ラスミド約3 $\mu$ gを0.2N NaOHにより変性し、配列決定用プライマーとアニールさせ、そしてキット添付の処方に従って<sup>35</sup>S-dATPより標識した。次に、標識されたDNAを、8M尿素を含有する6%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した後、ゲルを10%メタ

ノール及び10%酢酸により固定し、乾燥し、そしてオートラジオグラフィーにかけることにより塩基配列を決定した。各プラスミドのcDNAコード領域の塩基配列を配列番号：24～31に示す。

#### 【0116】実施例4. CDRの決定

L鎖及びH鎖のV領域の全般的構造は、互いに類似性を有しており、それぞれ4つのフレームワーク部分が3つの超可変領域、即ち相補性決定領域(CDR)により連結されている。フレームワークのアミノ酸配列は、比較的良く保存されているが、一方、CDR領域のアミノ酸\*10

\*配列の変異性は極めて高い(Kabat, E.A. ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」US Dept. Health and Human Services, 1983)。この様な事実に基づき、ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列をKabatらにより作成された抗体のアミノ酸配列のデータベースにあてはめて、相同性を調べることによりCDR領域を表6に示す如く決定した。

#### 【0117】

#### 【表6】

プラスミド	配列番号：	CDR (1)	CDR (2) (アミノ酸番号)	CDR (3)
p12-k2	24	24-38	54-60	93-101
p12-h2	25	31-35	50-66	99-105
pPM-k3	26	24-34	50-56	89-97
pPM-h1	27	31-36	51-66	99-108
p64-k4	28	24-38	54-60	93-101
p64-h2	29	31-35	50-66	99-109
p146-k3	30	24-34	50-56	89-97
p146-h1	31	31-35	50-66	99-106

#### 【0118】実施例5. クローン化されたcDNAの発現の確認(1)

##### 発現プラスミドの作製

PCR法によりクローン化されたAUK12-20の30  
カップ型L鎖及びH鎖のV領域をコードするcDNAからキメラL鎖/H鎖を作製した。マウスAUK12-20のV領域をコードするcDNAを、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)のエンハンサー及びプロモーターを含有する哺乳類細胞発現ベクター(HCMV発現ベクターと称する)(図1. 実施例8)中でヒトC領域をコードするDNAに容易に連結するためには、AUK12-20のV領域をコードするマウスcDNA配列の5'-末端及び3'-末端に便利な制限酵素切断部位を導入することが必要であった。

【0119】5'-末端及び3'-末端へのこれらの修飾はPCR法を用いて行った。2セットのPCRプライマーを設計しそして合成した。マウスL鎖V領域及びH鎖V領域の両方について、リーダー配列の始めをコードするDNAにハイブリダイズし、効率的な翻訳のために必須のDNA配列(Kozak, M., J. Mol. Biol. 196: 947-950, 1987)を維持しそしてHCMV発現ベクターへのクローニングのためのHindIII部位を形成するために、L鎖V領域後方プライマー(配列番号：32)、及びH鎖V領域後方プライマー(配列番号：33)を調製した。

イマー(配列番号：33)を調製した。

【0120】前方PCRプライマーは、J領域の末端をコードするDNAにハイブリダイズし、C領域へのスプライシングのために必須のDNA配列を維持しそしてHCMV発現ベクターでのヒトC領域への連結のためのBamHI部位を形成するように、L鎖V領域前方プライマー(配列番号34)、及びH鎖V領域前方プライマー(配列番号35)を調製した。

【0121】PCRによる増幅に続き、PCR生成物をHindIII及びBamHIにより消化し、ヒトκ鎖又はγ-1鎖C領域DNAを含有するHCMVベクターにクローン化し、そして塩基配列を決定してPCR法による増幅中にエラーが生じなかったことを確認した。得られる発現ベクターをHCMV-12k-gk及びHCMV-12h-gγ1と称する。HCMV発現ベクターの構造を図1に示す。プラスミドHCMV-V<sub>L</sub>-HC<sub>κ</sub>において、V<sub>L</sub>領域は任意のマウスL鎖V領域コード配列であることができる。この例において、AUK12-20κL鎖V領域を挿入することによりHCMV12k-gkを得た。プラスミドHCMV-V<sub>H</sub>-HC<sub>γ1</sub>において、V<sub>H</sub>領域は任意のマウスH鎖V領域コード配列であることができる。この例においてはAUK12-20のH鎖V領域を挿入してHCMV-12h-gγ1を得た。

### 【0122】COS細胞での一過性(transient)発現

キメラAUK12-20抗体のCOS細胞での一過性発現を見るため、前記発現ベクターをCOS細胞において試験した。Gene Pulsar装置(BioRad)を用いる電気穿孔法(electroporation)によりDNAをCOS細胞に導入した。すなわち、COS細胞を $1 \times 10^7$ 個/mlになるようにphosphate-buffered saline (PBS)に懸濁し、この細胞浮遊液0.8mlにDNA(各プラスミドについて $10 \mu\text{g}$ )を加えた。1,900ボルト(V)、25マイクロファラッド( $\mu\text{F}$ )の電気容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エクトロポレーションした細胞を、10%のウシ胎児血清を含有するDMEM培地(GIBCO)8mlに加えた。72時間のインキュベーションの後、培養上清を集め、遠心分離して細胞破片を除去し、そして無菌条件下で4℃にて短時間、又は-20℃にて長時間貯蔵した。

### 【0123】酵素免疫測定法(ELISA)によるキメラ抗体の定量

トランスフェクトされたCOS細胞の培養上清をELISAにより測定して、キメラ抗体が生産されていることを確認した。キメラ抗体を検出するため、プレートをやぎの抗-ヒトIgG(Whole molecule)(Sigma)によりコートした。ブロックした後、COS細胞からの培養上清を段階希釈しそして各ウエルに加えた。インキュベーション及び洗浄の後、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗-ヒトIgG( $\gamma$ 鎖特異的、Sigma)を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質緩衝液を加えた。インキュベーションの後、反応を停止しそして405nmにおける吸光度を測定した。標準として精製ヒトIgG(Sigma)を用いた。

### 【0124】ヒトIL-6Rへの結合能を確認するための酵素免疫測定(ELISA)

トランスフェクトされたCOS細胞からの培地をELISAにより測定して、生産されたキメラ抗体が抗原に結合し得るか否かを決定した。抗原への結合の検出のため、プレートをMT18マウスモノクローナル抗体(参考例1)でコートした。1%BSAでブロックした後、可溶性組換えヒトIL-6R(SR344)を加えた。洗浄した後、COS細胞からの培養上清を段階希釈し、そして各ウエルに加えた。インキュベーション及び洗浄の後、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗-ヒトIgGを加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質緩衝液を加えた。インキュベーションの後、反応を停止し、そして405nmにおける吸光度を測定した。

【0125】この結果を図2に示した。キメラ抗体AUK12-20をコードする遺伝子のCOS細胞へのトランスフェクションを実施した。このCOS細胞の培養上清サンプルは、IL-6Rに対する強い結合能を示し、

図2に○(オープンサークル)で示す如く、サンプルの希釈度(抗体の濃度)依存的に405nmにおける吸光度が変化し、サンプル中にIL-6Rレセプターに対する抗体が含まれていることが確認された。

### 【0126】ヒトIL-6RとIL-6の結合を阻害する能力の測定

トランスフェクトされたCOS細胞からの培養上清を測定して培地中に存在する抗体が、IL-6RとIL-6との結合を阻害するか否かを調べるために、ビオチン化IL-6との競合的結合阻害能を調べた。プレートをMT18マウスモノクローナル抗体(参考例1)でコートした。ブロッキングの後、可溶性組換えヒトIL-6R(SR344)を加えた。洗浄した後、COS細胞からのサンプルを段階希釈し、そしてビオチン化IL-6と共に各ウエルに加えた。

【0127】洗浄した後、アルカリホスファターゼ結合ストレプトアビジンを加えた。インキュベーション及び洗浄の後基質緩衝液を加えた。インキュベーションの後、反応を停止し、そして吸光度を405nmにて測定した。精製マウスAUK12-20モノクローナル抗体を陽性対照として用いた。無関係の抗体を発現するCOS細胞からの培地を陰性対照として用いた。

【0128】この結果を図3に示した。キメラ抗体AUK12-20をコードする遺伝子でトランスフェクトしたCOS細胞の培養上清は、最高、及び2番目に高いサンプル濃度でIL-6RとIL-6の結合を阻害した。すなわち、図3に●で示す如く、サンプル希釈度(抗体の濃度)依存的に405nmにおける吸光度が変化し、サンプル中の抗体がIL-6RとIL-6の結合を阻害していることが認められた。これは陽性対照の吸光度の抗体濃度依存的変化(○)にほぼ一致することからも確認出来た。なお、陰性対照(△)は阻害活性が全く認められなかった。

### 【0129】実施例6. クローン化cDNAの発現の確認(2)(キメラPM-1抗体の作製)

#### 発現ベクターの作製

キメラPM-1抗体を発現するベクターを作製するため、それぞれマウスPM-1 $\kappa$ L鎖及びH鎖V領域をコードするcDNAクローンpPM-k3及びpPM-h1をPCR法により変形し、そしてHCMV発現ベクター(図1を参照のこと)に導入した。

【0130】L鎖V領域のための後方プライマーpmk-s(配列番号:38)及びH鎖V領域のための後方プライマーpmh-s(配列番号:40)を、リーダー配列の最初をコードするDNAにハイブリダイズし且つKozakコンセンサス配列及びHindIII制限部位を有するように設計した。L鎖V領域のための前方プライマーpmk-a(配列番号:36)及びH鎖V領域のための前方プライマーpmh-a(配列番号:39)を、J領域の末端をコードするDNA配列にハイブリダイズ

し且つプライスドナー配列及びBamHI制限部位を有するように設計した。

【0131】 $\kappa$ L鎖V領域のため、2種類の前方プライマーを合成した。ほとんどの $\kappa$ L鎖においては、位置107のリジンが保存されているが、マウスPM-1 $\kappa$ L鎖においては位置107がアスパラギンである。キメラPM-1抗体の抗原結合活性に対するこの変化の効果を検討するため、前方プライマーpmk-b（配列番号：37）を、位置107がアスパラギンからリジンに変わるように設計した。

【0132】PCR反応に続き、PCR生成物を精製し、HindIII及びBamHIで消化し、そしてpUC19ベクター（Yanish-Perronら、Gene（1985）33：103-109）にサブクローニングした。DNA配列決定の後、HindIII-BamHI断片を切出し、そしてH鎖V領域については発現ベクターHCMV-VH-HC $\gamma$ 1にクローン化してHCMV-PMh- $\gamma$ 1を得、そしてL鎖V領域についてはHCMV-VL-HC $\kappa$ にクローン化してHCMV-PMk-a-gk及びHCMV-PMk-b-gkを得た。

#### 【0133】COS細胞のトランスフェクション

キメラPM-1抗体の一過性発現を観察するため、前記発現ベクターをCOS細胞において試験した。HCMV-pmh- $\gamma$ 1と、HCMV-pmk-a-gk又はHCMV-pmk-b-gkのいずれかをと、Gene Pulser装置（BioRad）を用いて電圧ポレーションによりCOS細胞に同時形質転換した。DNA（プラスミド当り10 $\mu$ g）を、PBS中1 $\times$ 10<sup>7</sup>細胞/mlの0.8mlのアリコートに加え、1,900V、25 $\mu$ Fの容量にてパルスを与えた。

【0134】室温にて10分間の回復期間の後、電圧ポレーション処理された細胞を、10%の $\gamma$ -グロブリン不含有ウシ胎児血清を含有するDulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM）（GIBCO）に加えた。72時間のインキュベーションの後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、そして無菌条件下で4℃にて短期間貯蔵し、又は-20℃にて長期間貯蔵した。

#### 【0135】キメラPM-1抗体の発現及び分析

3日間の一過性発現の後、COS細胞からの培地を集め、そしてキメラPM-1抗体について試験した。培地をまずELISAにより分析して、トランスフェクトされたCOS細胞によりヒト様抗体が生産されたか否かを決定した。このアッセイにおいて標準として既知量の精製ヒトIgGを用いることにより、COS細胞からの培地中に存在するヒト様抗体（この場合、キメラPM-1抗体）の量を推定することが可能である。

【0136】ヒト抗体の検出のため、プレートをヤギ抗-ヒトIgG（全体分子、Sigma）によりコートし

た。ブロッキングの後、COS細胞からのサンプルを段階希釈し、そして各ウェルに加えた。インキュベーション及び洗浄の後、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗-ヒトIgG（ $\gamma$ 鎖特異的、Sigma）を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質緩衝液を加えた。インキュベーションの後、反応を停止し、そして405nmでの吸光度を測定した。標準として精製ヒトIgG（Sigma）を加えた。

【0137】キメラPM-1抗体をコードする遺伝子を担持するベクターによりトランスフェクトされたCOS細胞からの培地はヒト様抗体の発現について陽性であり、そしておよそその量が上記のようにして測定された。次に、キメラPM-1抗体をコードする遺伝子を担持するベクターによりトランスフェクトされたCOS細胞からの同じ培地をヒトIL-6Rに結合する能力について測定した。抗原への結合の測定のため、プレートを、ヒトIL-6Rに対する抗体であるMT18マウスモノクローナル抗体（参考例1）によりコートした。ブロッキングの後、可溶性ヒトIL-6R（SR344）を加えた。

【0138】洗浄した後、サンプルを段階希釈し、そして各ウェルに加えた。インキュベーション及び洗浄の後、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗-ヒトIgG（ $\gamma$ 鎖特異的；Sigma）を添加した。インキュベーション及び洗浄の後、基質緩衝液を加えた。インキュベーションの後、反応を停止し、そして405nmでの吸光度を測定した。この測定のために標準品は存在しなかった。2個のサンプルの内の1つは、マウスPM-1抗体中に見られるV領域と同一のV領域を有するキメラ抗体（キメラPM-1a抗体、図4）をコードする遺伝子によるトランスフェクトからのサンプルであった。他の1つのサンプルはL鎖V領域中の位置107に前記のような1個のアミノ酸変化を有するキメラ抗体（キメラPM-1b抗体、図4）をコードする遺伝子によるトランスフェクションからのものであった。

【0139】いずれのサンプルも、サンプルの希釈により減少するIL-6Rに対する強い結合を示した。すなわち、作製されたキメラPM-1抗体は機能的であり、そしてその抗原によく結合することができる。最も重要なことは、機能的キメラPM-1抗体の証明は、正しいマウスPM-1V領域がクローン化されそして配列決定されたことの直接の証拠である。L鎖V領域中の位置107にいずれのアミノ酸を有するキメラ抗体も抗原IL-6Rによく結合した。

【0140】マウスPM-1抗体のL鎖V領域中の位置107は抗原結合のためにあまり重要ではなく、そしてこの位置におけるアスパラギン及びリジンのいずれも十分に機能するようである。マウスPM-1抗体はそのL鎖V領域のこの位置にアスパラギンを有するので、キメラPM-1抗体を用いるその後のすべての研究は、マウ

スPM-1抗体に見出されるそれと同じバージョンaを用いて行った。より多量のPM-1抗体を安定に生産するために、dhfr遺伝子を含有する新たなHCMV発現ベクターを作製した。キメラPM-1抗体のより高い発現レベルを達成するための第一段階は、ベクターHCMV-VH-HCγ<sub>1</sub> (図1)を変形して、このベクターが欠陥のある(crippled)SV40プロモーターエンハンサーにより発現されるdhfr遺伝子を含有するようにすることであった。

【0141】SV40エンハンサー要素をpSV2-dhfrベクター(S. Subramaniら、Mol. Cell. Biol. (1981) 1:854-864)から除去し、そしてSV40プロモーターによって発現されるneo遺伝子の代りに「欠陥のある」SV40プロモーターにより発現されるdhfr遺伝子をHCMV-VH-HCγ<sub>1</sub>に挿入した。次に、この新しいHCMV-VH-HCγ<sub>1</sub>-dhfrベクターにマウスPM-1 V領域を挿入した。この改良された発現ベクターの作製を実施例10に詳細に記載する。CHO dhfr (-)細胞(G. Vrlaubら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77:4216-4220)を2種類のプラスミドDNAすなわちキメラPM-1 a L鎖を発現するためのHCMV-VL-HCκベクター(HCMV-PMk a-gk)及びキメラPM-1 H鎖を発現するためのHCMV-VH-HCγ<sub>1</sub>-dhfrベクター(DHFR-ΔE-PMh-gγ<sub>1</sub>;実施例10)により同時形質転換した。

【0142】DNA(各プラスミドにつき10μg/ml)をPBS中1×10<sup>7</sup>細胞/mlの0.8mlのアリコートに加えた。1900Vの電圧25μFの電気容量でパルスを与えた。周囲温度にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、ヌクレオシド及び10%FCSを含有するAlpha Minimal Essential Medium培地(α-MEM)10mlに加えた。

【0143】一夜のインキュベーションの後、培地を、ヌクレオシドを含有せず10%FCS及び500μg/mlのG418(GIBCO)を含有するα-MEMに変えて、dhfr<sup>+</sup>及びneo<sup>+</sup>形質転換細胞の選択を行った。選択の後、選択されたクローンをを用いて遺伝子増幅を行った。2×10<sup>-8</sup>Mメソトレチアート(MTX)中での1ラウンドの増幅の後、約3.9μg/10<sup>6</sup>細胞/日のキメラPM-1 aの抗体を生産する細胞系(PM1k3-7)を選択した。

【0144】ヒトIL-6RへのIL-6の結合を阻害するキメラ抗体の能力についてのELISA測定  
トランスフェクトされたCOS細胞において又は安定なCHO細胞系において生産された抗体を測定して、それらが、IL-6Rへのビオチン化IL-6の結合と競争するか否かを決定した。プレートにマウス抗体MT18

によりコートした。ブロッキングの後、可溶性組換えヒトIL-6R(SR344)を加えた。洗浄の後、COS細胞からのサンプルを段階希釈し、そしてビオチン化IL-6と一緒に各ウェルに加えた。洗浄の後、アルカリホスファターゼ結合ストレプトアビジンを加えた。インキュベーション及び洗浄後、基質緩衝液を加えた。インキュベーションの後、反応を停止させ、そして405nmにおける吸光度を測定した。結果を図5に示す。

【0145】実施例7. 再構成ヒトPM-1抗体の作製  
より迅速に且つより効率的にCDR移植を達成するため、PCRによる逐次CDR移植法を開発した。この方法はPCR変異誘発法(Kammanら、Nucleic Acid. Res. 17:5404, 1989)に基く。CDR移植のための選択されたヒトFRを含有する鋳型DNAを調製するために、適当な再構成ヒトV領域を便利なベクターに再クローニングする必要があった。プラスミドaly11及びF10のDNAはそれぞれ再構成ヒトD1.3のL鎖及びH鎖をコードしており、ヒトREIからのFR及びNEWからのFRをそれぞれ含有する。再構成ヒトD1.3のL鎖V領域をコードするDNA配列を含有する約500bpのNcoI-BamHI断片をaly11から切り出し、そしてHindIII及びBamHIで開裂されたpBR327にサブクローニングしてプラスミドV1-lys-pBR327を得た。

【0146】このV1-lys-pBR327からのHindIII-BamHI断片を、HindIII及びBamHIにより開裂されたpUC19に挿入してプラスミドV1-lys-pUC19を得た。再構成ヒト1.3のH鎖V領域をコードするDNA配列を含有する約700bpのNcoI-BamHI断片をF10から切り出し、そしてHindIII-NcoIアダプターを用いてpBR327のHindIII-BamHI部位にサブクローニングし、Vh-lys-pBR327を得た。次に、このプラスミドからHindIII-BamHI断片を切り出し、そしてHindIII及びBamHIにより開裂されたpUC19にサブクローニングしてVh-lys-pUC19を得た。

【0147】なお、プラスミドaly11及び再構成ヒトD1.3のL鎖V領域FRをコードするDNA配列はヒト型化CAMPATH1H抗体(Nature 332:323-327 (1988))のそれと同じである。鋳型として使用した、プラスミドF10中の再構成ヒトD1.3のH鎖V領域をコードするDNA配列は、V. Verhoeyら、Science 237:1534-1536 (1988)のFig. 2に記載されている。図6は、再構成ヒトPM-1のH鎖V領域の第一バージョンの作製のために使用されたプライマー及びPCR反応を模式的に示す。後方プライマーA(APCR 1;配列番号:41)及び前方プライマーE(APCR

4; 配列番号: 42) は、このベクター上のDNA配列にハイブリダイズする。APCR1及びAPCR4はpUC19ベクターのために特に設計されたが、ユニバーサルM13配列プライマーを使用することもできる。

【0148】CDR1移植/変異誘発プライマーB (phv-1; 配列番号: 43)、CDR2移植プライマーC (phv-2; 配列番号: 44)、及びCDR3移植プライマーD (phv-3; 配列番号: 45) は40~60bpの長さを有し、マウスPM-1のH鎖V領域のCDR及び該CDRを挟む鋳型DNA中のヒトFRをコードするDNA配列から成る。第一のPCR反応において前方プライマーAPCR4及び後方プライマーDを用いた。マウスPM-1のCDR3配列を含有する第一PCR生成物を精製し、そして第二PCR反応において後方プライマーとしてのプライマーCと共に前方プライマーとして使用した。

【0149】同様に、マウスPM-1のCDR2及びCDR3を含有する第二PCR生成物、並びにマウスPM-1の3個すべてのCDRを含有する第三PCR生成物をそれぞれ次のPCR段階のプライマーとして使用した。完全な再構成ヒトPM-1 H鎖V領域を有する第四PCR生成物を精製し、HindIII及びBamHIにより消化し、そしてさらに分析するためにpUC19にサブクローニングした。

【0150】再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域の作製のために3種類の変異誘発プライマーphv-1, phv-2及びphv-3を合成した。これらは8M尿素を含有する12%ポリアクリルアミドゲル上で精製した。変異誘発プライマーphv-1は、マウスPM-1のCDR1の移植のためのみならずヒトFR1中の位置27及び30におけるそれぞれのSerからTyrへ、及びSerからThrへの変異のために設計された。

【0151】各100μlのPCR反応物は典型的には10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 250μM dNTP, 50ngの鋳型DNA (Vh-lys-pUC19), 2.5uのAmpli Taq (Perkin Elmer Cetus), 及びプライマーを含有した。1μMずつのphv-3プライマー及びAPCR4プライマーを含む第一のPCR反応を行い、94℃にて1.5分間の最初の変性の後、94℃にて1分間、37℃にて1分間及び72℃にて1分間の30サイクルを反復した。アニーリング段階と合成段階の間の変温時間は2.5分間であった。最終サイクルの完了の後、72℃にて10分間の最終伸長反応を行った。523bpのPCR生成物を1.6%低融点アガロースゲルを用いて精製し、そして次に第二のPCR反応におけるプライマーとして使用した。

【0152】第二のPCR反応において約1μgの精製された第一PCR生成物及び25pmoleの変異誘発

プライマーphv-2をプライマーとして使用した。PCR条件は第一のPCR反応について記載したのと同じであった。同様に、第二のPCR反応からの665bpのPCR生成物をプライマーphv-1と共に第三のPCR反応において使用し、そして第三のPCR反応からの737bpのPCR生成物をプライマーAPCR1と共に第四のPCR反応において使用した。第四のPCR反応からの1.172kbのPCR生成物を精製し、HindIII及びBamHIで消化し、そして次に再構成ヒトPM-1 H鎖V領域を含有する約700bpの断片をpUC19ベクターにサブクローニングした。配列決定した4個のクローンの内2個が正しいアミノ酸配列をコードするDNA配列を有しており、そしてpUC-RVh-PM1aと命名した。

【0153】再構成PM-1 H鎖V領域の他のバージョンを作製するため5種類の変異誘発PCRプライマーを合成した。各PCR反応は前記の反応条件と本質的に同じ条件下で行われた。バージョン「b」のため、変異誘発プライマーphv-m4 (Val-71→Arg-71) (番号はKabataらによる; 表4参照) (配列番号: 46) 及びAPCR4を、鋳型DNAとしてのpUC-RVh-PM1aと共に第一PCR反応において使用した。この第1PCR反応からのPCR生成物を精製し、そしてプライマーAPCR1と共に第二PCR反応における前方プライマーとして使用した。第二PCR反応からのPCR生成物を1.6%低融点アガロースゲルを用いて精製し、HindIII及びBamHIにより消化し、そしてpUC19にてサブクローニングしてpUC-RVh-PM1bを得た。

【0154】同様に、変異誘発プライマーphv-nm (Asp-1→Gln-1) (配列番号: 47) 及び鋳型pUC-RVh-PM1bを用いてバージョン「c」(pUC-RVh-PM1c)を得、変異誘発プライマーphv-m6 (Ile-48→Met-48) (配列番号: 48) 及び鋳型pUC-RVh-PM1bを用いてバージョン「d」(pUC-RVh-PM1d)を得、変異誘発プライマーphv-nm及び鋳型pUC-RVh-PM1cを用いてバージョン「e」(pUC-RVh-PM1e)を得、そして変異誘発プライマーphv-m7 (Thr-28→Ser-28、及びPhe-29→Ile-29) (配列番号: 49) 及び鋳型pUC-RVh-PM1bを用いてバージョン「f」(pUC-RVh-PM1f)を得た。再構成H鎖V領域バージョン「f」のアミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列を配列番号54に示す。

【0155】図7は、再構成ヒトPM-1 L鎖V領域の第一バージョンの作製において使用したプライマー及びPCR反応を模式的に示す。再構成ヒトPM-1 L鎖V領域の第一バージョンの作製のため、CDR1移植プライマーpkv-1 (配列番号: 50)、CDR2移

41

植プライマー-pkv-2 (配列番号: 51) 及びCDR3 移植プライマー-pkv-3 (配列番号: 52) を合成し、そして8M尿素を含有する12%ポリアクリルアミドゲル上で精製した。

【0156】前記のようにしてPCR反応を行った。第一PCR反応物は1 $\mu$ Mずつのpkv-3プライマー及びAPCR4プライマーを含有した。第一PCR反応からの350bpのPCR生成物を1.5%低融点アガロースゲルを用いて精製し、そして第三PCR反応における前方プライマーとして使用した。第二PCR反応からのPCR生成物を精製し、BamHI及びHindIIIで消化し、そしてCDR3が移植されたDNAを含有する500bp断片をDNA配列決定のためにpUC19ベクターにサブクロニングした。

【0157】正しい配列を有するプラスミドDNAを同定し、そして次のPCR反応における鋳型DNAとして使用した。第三PCR反応において25pmoleの変異誘発プライマー-pkv-2及びAPCR4を使用した。第二PCR反応からのPCR生成物を精製し、そしてプライマー-pkv-1と共に第四PCR反応におけるプライマーとして使用した。同様にして、第四PCR反応からのPCR生成物をAPCR1プライマーと共に第五PCR反応におけるプライマーとして使用した。

【0158】第五PCR反応からの972bpのPCR生成物を精製し、BamHI及びHindIIIにより消化し、そしてDNA配列決定のためにpUC19にサブクロニングした。CDR2領域において問題点が認識され、さらに2回のPCR反応が必要であった。第六PCR反応及び第七PCR反応において、pUC19ベクターにクロニングされた第五PCR反応からのPCR生成物を鋳型DNAをして使用した。第六PCR反応においてプライマーはpkv-2及びAPCR4であった。第六PCR反応からのPCR生成物を精製し、そしてAPCR1プライマーと共に第七PCR反応におけるプライマーとして使用した。第七PCR反応からのPCR精製物を精製し、BamHI及びHindIIIにより消化し、そして500bpDNA断片をDNA配列決定のためにpUC19にサブクロニングした。配列決定した5個のクローンの内2個のクローンが正しいDNA配列を有していた。このクローンをpUC-RV1-PM1aと称する。この配列を配列番号: 55に示す。

【0159】再構成ヒトPM-1 L鎖V領域の他のバージョンの作製のため、変異誘発プライマー-pvk-m1 (配列番号: 53) を合成した。PCR反応は本質的に前記の通りであった。第一PCR反応において、変異誘発プライマー-pkv-m1 (Phe-71 $\rightarrow$ Tyr-71) 及びAPCR4プライマーを鋳型DNAとしてのpUC-RV1-PM1aと共に使用した。第一PCR反応からのPCR生成物を精製し、そしてAPCR1プライマーと共に第二PCRプライマーにおけるプライマ

42

ーとして使用した。第二PCR反応からのPCR生成物を精製し、BamHI及びHindIIIにより消化し、そしてDNA配列決定のためにpUC19にサブクロニングした。このクローンをpUC-RV1-PM1bと命名した。

【0160】実施例8. 遺伝子操作された抗体を哺乳類細胞中で発現させるためのヒトサイトメガロウイルス前期 (HCMV) プロモーターを用いるベクターの作製 (図1)

10 キメラPM-1抗体のL鎖V領域をコードするDNA断片及びキメラPM-1抗体のH鎖V領域をコードするDNA断片を、それぞれ、哺乳類細胞中でヒト $\kappa$ L鎖又はヒト $\gamma$ -1 H鎖を発現するように設計されたHCMV発現ベクター (図1を参照のこと) HCMV-VL-KC $\kappa$ 及びHCMV-VH-HC $\gamma$ 1にまず挿入した。

【0161】該HCMV発現ベクターの作製のための詳細な記載は、Maedaら、Human Antibodies and Hybridomas (1991) 2:124-134; C. A. Kettleboroughら、Protein Engineering (1991) 4:773-783に公表されている。両ベクターはpSV2neo (P. J. Southern et al., J. Mol. Appl. Genet. (1982) 1:327-341) に基礎を置き、そして免疫グロブリンL鎖又はH鎖の高レベルの転写のためにヒトサイトメガロウイルス (HCMV) プロモーター及びエンハンサー (M. Boshartら、Cell (1985) 41:521-530) を含有する。

【0162】L鎖発現ベクターはヒト $\kappa$ C領域 (T. H. Rabbittsら、Carr. TOP. Microbiol. Immunol. (1984) 114:166-171) をコードするゲノムDNAを含有し、そしてH鎖発現ベクターはヒト $\gamma$ -1C領域 (N. Takahashiら、Cell (1982) 29:671-679) をコードするゲノムDNAを含有する。これらのHCMV発現ベクターは多能であり、そして種々の哺乳類細胞タイプにおける一過性 (transient) 発現及び安定な発現のために使用することができる。

【0163】実施例9. 遺伝子操作された抗体を哺乳類細胞中で発現させるためのヒトエロンゲーションファクター1 $\alpha$  (HEF-1 $\alpha$ ) プロモーターを使用するベクターの作製 (図8及び図9)

40 ヒト・ポリペプチド・チェーン・エロンゲーション・ファクター1 $\alpha$  (HEF-1 $\alpha$ ) は最も豊富な蛋白質の1つである。これはほとんどの細胞で発現される。ヒトHEF-1 $\alpha$ プロモーター・エンハンサーの転写活性はSV40前期プロモーター・エンハンサーのそれに比べて約100倍である (D. W. Kimら、Gene (1990) 91:217-223; 及びT. Uetsukiら、J. Biol. Chem. (1989) 264:5

791-5798)。

【0164】2.5kbのHEF-1 $\alpha$ プロモーター-エンハンサー領域は、該遺伝子の5'-末端に接する約1.5kbのDNA、第一エクソン中の33bp、第一イントロン中の943bp、及び第二エクソンの最初の部分の10bpから成る。この後2.5kbのHindIII-EcoRI断片をプラスミドpEF321-CAT (D. W. Kimら、Gene (1990) 91:217-223; 及びT. Uetsukiら、J. Biol. Chem. (1989) 264:5791-5798) から切り出し、そしてpdkCRベクター (M. Tsuchiyaら、Embo J. (1987) 6:611-616)、K. O'Haraら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 78, No. 3, 1527-1531, (1981)、(R. Fukunagaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 81, 5086-5090 (1984))にクローニングして、SV40前期プロモーター-エンハンサーを含有する約300bpのHindIII-EcoRI断片を置き換えてpTEF-1を得た。

【0165】pTEF-1をEcoRIで消化し、Klenowポリメラーゼでフィルインし、そしてHindIII リンカーに連結した。次に、この修飾されたpTEF-1ベクターDNAから約1.6kbのHindIII-SmaI断片を切り出した。HCMV-12h-g $\gamma$ 1をEcoRIにより部分消化し、Klenowポリメラーゼによりフィルインし、そして自己連結することにより、実施例5において作製したHCMV-12h-g $\gamma$ 1からプラスミドHCMV-12h-g $\gamma$ 1 ( $\Delta$ E2)を作製した。

【0166】プラスミドHCMV-12h-g $\gamma$ 1 ( $\Delta$ E2)をEcoRIで消化し、Klenowポリメラーゼでフィルインし、そしてHindIIIで消化した。ヒト $\alpha$ -1C領域をコードするDNA配列を含有する約7kbの断片を、HEF-1 $\alpha$ プロモーター-エンハンサーを含有する前記の1.6kb HindIII-SmaI断片に連結してHEF-12h-g $\gamma$ 1を得た。このベクター中のHEF-1 $\alpha$ プロモーター-エンハンサー領域は、5'-領域に接する380bpのDNAを除き、pTEF-1中のそれと同一であった。HindIII-BamHI断片として存在するこのH鎖V領域は、他のH鎖V領域と容易に交換することができる。

【0167】再構成H鎖V領域を含有するHindIII-BamHI DNA断片をpUC-RVh-PM1a, pUC-RVh-PM1b, pUC-RVh-PM1c, pUC-RVh-PM1d, pUC-RVh-PM1e及びpUC-RVh-PM1f (実施例7) から切り出し、そして前記のプラスミドHEF-12h-g $\gamma$ 1のHindIII-BamHI部位に挿入して、それぞれ発現ベクターRVh-PM1a, RVh-PM1b,

RVh-PM1c, RVh-PM1d, RVh-PM1e, 及びRVh-PM1fを得た。発現ベクターRVh-PM1a, RVh-PM1b, RVh-PM1c, RVh-PM1e, 及びRVh-PM1f、並びにHEF-PMh-g $\gamma$ 1は、それぞれ再構成ヒトPM-1 H鎖V領域バージョン「a」, 「b」, 「c」, 「d」, 「e」及び「f」、並びにマウスPM-1 H鎖V領域を有する。

【0168】L鎖発現ベクターHEF-12k-gkを作製するため、HEF-1 $\alpha$ プロモーター-エンハンサー領域を含有する約3.0kbのPvuI-HindIII断片をHEF-12h-g $\gamma$ 1から切り出し、そして実施例5において作製したHCMV-L鎖発現ベクターHCMV-12k-gkからの約7.7kbのPvuI-HindIII断片に連結してHEF-12k-gkを得た。H鎖発現ベクターHEF-12h-g $\gamma$ 1の場合と同様に、HindIII-BamHI断片として存在するHEF-12k-gk中のL鎖V領域は他のL鎖V領域と容易に交換することができる。なお、プラスミドHEF-PMh-g $\gamma$ 1は、HEF-12h-g $\gamma$ 1 (図8) のEF1 $\alpha$ プロモーター領域 (PvuI-HindIII断片) によりHCMV-pmh-g $\gamma$ 1のHCHVプロモーター領域 (PvuI-HindIII断片) を置き換えることにより作製したものである。

【0169】再構成ヒトL鎖V領域を含有するHindIII-BamHI DNA断片をpUC-RV1-PM1a及びpUC-RV1-PM1b (実施例7) から切り出し、そしてHEF-12k-gkのHindIII-BamHI部位に挿入し、それぞれ発現ベクターRV1-PM1a及びRV1-PM1bを得た。発現ベクターRV1-PM1a及びRV1-PM1b、並びにHEF-PMK-gkはそれぞれ再構成ヒトL鎖V領域「a」及び「b」、並びにマウスPM-1 L鎖V領域を有する。なお、プラスミドHEF-PMK-gkは、HEF-12k-gk (図9) のEF1 $\alpha$ プロモーター領域 (PvuI-HindIII断片) によりHCMV-pmk-a-gkのHCMVプロモーター領域 (PvuI-HindIII断片) を置き換えることにより作製したものである。

【0170】実施例10. 遺伝子操作された抗体をCHO細胞中で高レベルで発現させるための、欠陥SV40プロモーター-エンハンサー配列に連結されたジヒドロフォレートレクターゼ (dhfr) 遺伝子を用いるベクターの作製 (図10及び図11)

SV40前期プロモーターからエンハンサー配列を除去するため、プラスミドpSV2-dhfr (S. Subramaniら、Mol. Cell. Biol. (1981) 1:854-864) (ATCC33694) をSphI及びPvuIIで消化し、Klenowポリメラーゼでフィルインし、そして自己連結してpSV2-



d h f r-ΔEを得た(図10)。HCMVプロモーター、H鎖V領域及びヒトγ-1 C領域を含有する約3.7kbのEcoRI断片を、EcoRIによる部分消化によりHCMV-PMh-gγ1から切り出した。この断片を、EcoRI-消化pSV2-d h f r-ΔEに連結してDHFR-ΔE-PMh-gγ1を得た。

【0171】HEF-1αプロモーター-エンハンサーを用いるH鎖発現ベクターに基いて類似のベクターを作製した(図11を参照のこと)。HCMV-12h-gγ1に由来する約3.7kbのEcoRI断片を、EcoRI-消化pSV2-d h f r-ΔEと連結してDHFR-ΔE-12h-gγ1を得た。DHFE-ΔE-12h-gγ1中のd h f r配列に続くBamHI部位を、BamHIによる部分消化、Klenowポリメラーゼによるフィラーイン及び自己連結により除去した。d h f r cDNAを含有する約4kbのPvuI-BamHI断片をこの修飾されたDHFR-ΔE-12h-gγ1から切り出し、そして実施例12において作製したRVh-PM1f-4からの約3kbのPvuI-BamHI断片に連結してDHFR-ΔE-RVh-PM1fを得た。上記の改良されたプラスミドは本発明の再構成ヒトPM-1抗体の製造のために使用することができる。

#### 【0172】実施例11. 再構成ヒトPM-1抗体の種々のバージョンの発現及び分析

再構成ヒトPM-1のL鎖及びH鎖を発現する各HEF-1αベクターをCOS細胞に同時形質転換(c o o t r a n s f e c t)した。標準対照としてキメラPM-1抗体のL鎖及びH鎖を発現する各HEF-1αベクターもCOS細胞に同時形質転換した。3日後、形質転換されたCOS細胞からの培地を集め、そしてELISAにより(1)上清中に存在するヒトIgG抗体の量について、及び(2)IL-6Rに結合するそのIgGの能力について分析した。次に、同じサンプルをさらに、ELISAにより、ヒトIL-6RへのヒトIL-6の結合を阻害する該抗体の能力について試験した。

【0173】再構成ヒトPM-1 L鎖を発現する2種類のベクターの一方(RV1-PM1a又はRV1-PM1b)及びキメラPM-1 H鎖を発現するベクター(HCMV-PMh-gγ1)によりCOS細胞を同時形質転換することにより、再構成ヒトPM-1 L鎖V領域の2種類のバージョンの評価を行った。細胞をまた、キメラPM-1 L鎖及びH鎖を発現する各ベクター(HCMV-PMka-gk及びHCMV-PMh-gγ1)により同時形質転換した。未精製のCOS細胞上清を用いるデータは、IL-6Rへの結合についての測定において、再構成ヒトPM-1 L鎖のバージョン「a」がキメラPM-1 L鎖と同等であることを示した。しかしながら、再構成ヒトPM-1 L鎖のバージョン「b」はIL-6Rへの結合能を実質的に保持しなかった。これらの結果から、FR3中の位置71のフ

ェニルアラニン(CAMPAHTH-1Hのために修飾されたヒトREI中に存在する)からチロシン(天然ヒトREI及びマウスPM-1中に存在する)への変化は機能的抗原結合部位の形成に対して非常に有害であることが結論された。

【0174】再構成ヒトL鎖V領域のバージョン「a」が、IL-6Rの結合するその能力においてマウスPM-1抗体L鎖V領域と同等であることが明らかになったので、再構成ヒトPM-1 L鎖V領域の更なるバージョンの設計及び作製は行わなかった。再構成ヒトPM-1 H鎖V領域の種々のバージョンを評価する次の実績において、再構成ヒトPM-1 L鎖V領域のバージョン「a」を常に用いた。

【0175】再構成ヒトPM-1 H鎖の発現する6種類のベクターの1つ(RVh-PM1a, RVh-PM1b, RVh-PM1c, RVh-PM1d, RVh-PM1e又はRVh-PM1f)及び再構成ヒトPM-1 L鎖のバージョン「a」を発現するベクター(RV1-PM1a)によりCOS細胞を同時形質転換することにより、再構成ヒトPM-1 H鎖V領域の6種類のバージョンを評価した。細胞を、キメラPM-1 L鎖及びH鎖を発現する各ベクター(HEF-PMka-gk及びHEF-PMh-gγ1)によっても同時形質転換した。未精製のCOS細胞上清を用いた予備データが示すところによれば、IL-6Rへの結合についての測定において、再構成ヒトPM-1 L鎖のバージョン「a」及び再構成ヒトPM-1 H鎖のバージョン「f」は、キメラPM-1 L鎖及びH鎖と同等であった。キメラPM-1抗体との比較において、再構成ヒトPM-1 H鎖の他の5種類のバージョン+再構成ヒトPM-1 L鎖のバージョン「a」は種々の程度で低下したIL-6Rへの結合を示した。

【0176】この予備データを確認するため、キメラPM-1抗体及び再構成ヒトPM-1抗体をCOS細胞上清から濃縮そしてプロテインAを用いて精製した。すなわち、COS細胞からの培地を100kdカットオフ限外濾過装置(Amicon)を用いて濃縮した。濃縮した培地をプロテインAアガロース(Affigel Protein A MAPSIIキット、BioRad)を用いて精製した。要約すれば、濃縮された培地を、5ベッドポリウムの結合緩衝液により平衡化されたプロテインAアガロースカラムに適用した。カラムを15ベッドポリウムの結合緩衝液で洗浄し、そして次に5ベッドポリウムの溶出緩衝液を適用した。溶出液を濃縮し、そしてマイクロコンセンレーター(Centricon 10, Amicon)を用いて緩衝液をPBSに変えた。精製された抗体を更なる分析のために用いた。

【0177】キメラPM-1抗体、及び再構成ヒトL鎖V領域のバージョン「a」と再構成ヒトH鎖V領域のバージョン「a」、「b」、「c」、「d」、「e」又は

「f」とから成る再構成ヒトPM-1抗体の精製されたサンプルの分析を行った。L鎖の「a」バージョン+H鎖の「f」バージョンが明らかに最良の再構成ヒトPM-1抗体であった。このものは、キメラPM-1抗体と同様にIL-6Rに結合する(図13)。これはまた、マウス抗体及びキメラ抗体と同様に、ヒトIL-6がIL-6Rに結合するのを阻害する(図14)。再構成ヒトL鎖V領域のバージョン「a」との組合せにおいて、再構成ヒトH鎖V領域のバージョン「b」及び「e」はIL-6Rとの良好な結合を示すが、それらの結合においてキメラPM-1抗体と同等ではない。再構成ヒトL鎖V領域のバージョン「a」との組合せにおいて、バージョン「c」及び「d」はIL-6Rとの中程度の結合を示し、そして再構成ヒトH鎖V領域のバージョン「a」はIL-6Rとの貧弱な結合を示す。

#### 【0178】実施例12. 発現レベルを改良するための再構成ヒトPM-1 V領域の修正

再構成ヒトPM-1 L鎖及びH鎖のV領域(配列番号: 54及び55)のリーダー配列をコードするDNA配列内のイントロンを除去するため、V領域をコードするcDNAをPCRプライマーを用いて再クローニングした。L鎖及びH鎖の発現ベクターRV1-PM1a及びRVh-PM1fをCOS細胞に同時形質転換した。48時間後、全RNAを調製し(Chirgwinら、Biochemistry (1979) 18: 5294-5299)、そしてマウス抗体V領域のPCRクローニングについて記載したようにして一本cDNA合成のために5µgの全RNAを用いた。3種類のPCRプライマーを設計し、そして合成した。LEV-P1(配列番号: 60)及びHEV-P1(配列番号: 58)はスプライスドナー配列及びBamHI部位を含有し、そしてそれぞれL鎖及びH鎖のV領域のための前方プライマーとして使用した。

【0179】HEV-P2(配列番号: 59)はHindIII部位及びATG開始コドンの前のKozakコンセンサス配列を含有し、そしてL鎖及びH鎖のV領域のための後方プライマーとして使用した。100µlずつのPCR反応物は20mM Tris-HCl (pH 8.8), 10mM KCl, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100, 0.1µgのBSA, 250µM dNTP, 2.5uのVent DNAポリメラーゼ(Bio. Labs, U. K.), 50%の一本cDNA合成反応物並びに100pmoleずつの前方プライマー及び後方プライマーを含有した。各PCRチューブは50µlの鉱油で覆い、そして94℃にて1.5分間の最初の変性の後、94℃にて1分間、50℃にて1分間及び72℃にて1分間のサイクル反応を30回行い、そして次に72℃にて10分間インキュベートした。L鎖V領域を含有する408bpのPCR生成物及びH鎖V領域を含有する44

4bpのPCR生成物を、2.0%低融点アガロースゲルを用いて精製し、そしてBamHI及びHindIIIにより消化し、そしてpUC19ベクターにサブクローニングし、それぞれpUC-RV1-PM1a-3及びpUC-RVh-PM1f-3を得た。

【0180】再構成ヒトPM-1 L鎖及びH鎖のV領域のDNA配列は不適切なスプライスドナー部位及びアクセプター部位を含有することが明らかになった(配列番号: 54及び55を参照のこと)。L鎖V領域内のこれらの部位は高頻度には使用されない(mRNAの約10%)が、H鎖V領域内のこれらの部位は高頻度で使用される(mRNAの約90%)。この異常なスプライシングが再構成ヒトPM-1抗体の低レベルの発現をもたらした。V領域の異常なスプライシングを回避するため、スプライスドナー部位をPCR法により除去した。H鎖V領域について、後方プライマーNEW-SP1(配列番号: 61)及び前方プライマーNEW-SP2(配列番号62)を合成した。このプライマーはDNA配列TGGGTG AGAをDNA配列TGG GTT CGCに変える。PCR反応の条件はcDNAのクローニングについて前記した通りであったが、鋳型DNAは50ngのpUC-RVh-PM1f-3であり、そしてプライマーはHEV-P2とNEW-SP2、又はHEF-P1とNEW-SP1のいずれかであった。

【0181】2個のPCR反応からのPCR生成物を2%低融点アガロースゲルを用いて精製し、そしてPCR連結反応において使用した。0.5µgの第一PCR生成物を含有する98µlのPCR反応物及び5ユニットのVent DNAポリメラーゼを94℃にて2分間、50℃にて2分間及び72℃にて5分間インキュベートし、そして次に100pmoleずつのHEV-P1プライマー及びHEV-P2プライマーを加えた。PCRチューブを30µlの鉱油で覆い、そして94℃にて1分間、50℃にて1分間及び72℃にて1分間の25サイクルのPCRにかけ、そして次に72℃にて10分間インキュベートした。

【0182】同様にして、再構成ヒトPM-1 L鎖V領域中のスプライスドナー領域をPCRプライマーREI-SP1(配列番号: 63)及びREI-SP2(配列番号: 64)を用いて除去した。該プライマーはDNA配列CAG GTA AGGをDNA配列CAG GAA AGGに変える。両PCR生成物、すなわちL鎖V領域についての408bpのDNA断片及びH鎖V領域についての444bpのDNA断片を2.0%低融点アガロースゲルを用いて精製し、HindIII及びBamHIにより消化し、そして配列決定のためpUC19にサブクローニングした。RVh-PM1fのHindIII-BamHI断片を、pUC-RVh-PM1f-4のHindIII-BamHI領域と置き換えることにより、RVh-PM1f-4を得た。再構成ヒトP

H-1 L鎖V領域のイントロンが除去されたバージョン「a」の配列を配列番号57に示し、再構成ヒトPM-1 H鎖V領域のイントロンが除去されたバージョン「f」の配列を配列番号56に示す。

# 【0183】

【参考例】本発明において使用される出発ハイブリドーマは次の様にして作製された。

## 参考例1. ハイブリドーマ MT18の作製

ヒトIL-6Rに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを作製するため、免疫原として、細胞表面にヒトIL-6Rを発現するマウスT細胞を次の様にして作製した。すなわち、Y. Hirataら、J. Immunol. Vol. 143, 2900-2906 (1989)に開示されているプラスミドpZipneo IL-6Rを常法に従ってマウスT細胞系CTLL-2 (ATCC TIB214)にトランスフェクトし、生ずる形質転換体を常法に従ってG418を用いてスクリーニングすることにより細胞あたり約30,000個のIL-6Rを発現する細胞系を得た。この細胞系をCTBC3と称する。

【0184】CTBC3細胞を常法に従ってRPMI 1640中で培養し、そして培養細胞をPBS緩衝液により4回洗浄し、そして $1 \times 10^7$ 個の細胞をC57BL/6マウスに腹腔内注射して免疫感作した。この免疫感作は1週間に1回6週間にわたって行った。この免疫感作されたマウスから脾臓細胞を得、そして常法に従ってポリエチレングリコールを用いて骨髓腫P3U1細胞を融合せしめ、そして融合した細胞を次の様にしてスクリーニングした。IL-6R陰性ヒトT細胞系JURKAT (ATCC CRL 8163)を、プラスミドpZipneo IL-6Rにより同時トランスフェクトし、そして形質転換された細胞をスクリーニングして、細胞当たり約100,000個のIL-6Rを発現する細胞系を得た。この細胞系をNJBC8と命名した。

【0185】NP-40で細胞溶解したNJBC8を認識するがしかしNP-40で細胞溶解したJURKATを認識しない抗体を生産するハイブリドーマ細胞系をクローン化しそしてMT18と命名した。ハイブリドーマMT18は、工業技術院微生物工業技術研究所にブダベスト条約のもとに1990年7月10日に微工研条寄第2999号 (FERM BP-2999)として寄託された。

## 【0186】参考例2. ハイブリドーマPM1の作製

ヒトIL-6Rに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを作製するため、抗原として、ヒトIL-6Rを次の様にして抽出した。 $3 \times 10^9$ 個のヒト骨髓腫細胞 (IL-6R生産細胞)を1mlの1%ジギトニン、10mMトリエタノールアミン緩衝液 (pH7.4), 0.15M NaCl及び1mMPMSF (フェニルメチルスルホニルフルオリド; 和光純薬)中で溶解した。他

方、参考例1において調製したハイブリドーマMT18により生産されたMT18抗体を、ブロムシアンで活性化されたセファロース4B (Pharmacia)に常法に従って結合させた。

【0187】このMT18抗体結合セファロース4Bを前記の細胞溶解物を混合することにより、セファロース4B上のMT18抗体に前記可溶性IL-6Rを結合させた。セファロース4Bに非特異的に結合した物質を洗浄除去し、そしてSephacrose 4BにMT18抗体を介して結合したIL-6Rを免疫原として使用した。前記の免疫原を用いてBALB/cマウスを1週間に1回4週間にわたり腹腔内に免疫感作した。次に、この免疫感作されたマウスから脾臓細胞を得、そして常法に従ってポリエチレングリコールを用いて骨髓腫細胞P3U1と融合せしめた。融合した細胞を次のようにしてスクリーニングした。まず、培養上清及び0.01mlのProtein Gセファロース (Pharmacia)を混合して上清中の免疫グロブリンをProtein Gセファロースに吸着せしめた。

【0188】他方、 $^{35}\text{S}$ -メチオニンにより内部標識された $10^{11}$ 個のU266細胞を溶解し、そしてMT18結合セファロース4Bを用いてIL-6Rをアフィニティ精製した。次に、 $^{35}\text{S}$ -メチオニンで標識されたIL-6Rを、免疫グロブリンが結合している上記のProtein Gセファロースにより免疫沈降せしめ、そして沈澱をSDS-PAGEにより分析した。その結果、IL-6Rに特異的に結合する抗体を生産する1個のハイブリドーマクローンを単離し、そしてPM1と命名した。ハイブリドーマPM1は工業技術院微生物工業技術研究所にブダベスト条約のもとに1990年7月10日に、微工研条寄第2998号 (FERM BP-2998)として寄託された。

## 【0189】参考例3. ハイブリドーマAUK12-20, AUK64-7及びAUK146-15の作製

免疫原として可溶性IL-6R (SR 344)を、Yasukawa, K. らの、J. Biochem. 108, 673-676, 1990、に記載されている方法に従って調製した。すなわち、N-末端から345番目のコドンが終止コドンにより置換されているIL-6RをコードするcDNAを含有するプラスミドpECEdhfr344をCHO (5E27)細胞にトランスフェクトし、そのトランスフェクトされた細胞を無血清培地 (SF-0培地、三光純薬)中で培養し、そして得られる上清をHF-Lab1系 (東ソー)により濃縮しそしてBlue-5PWカラム及びPhenyl-5PWカラムにより精製した。精製された可溶性IL-6RはSDS-PAGEで単一バンドを示した。

【0190】雌性BALB/cAnNCrjマウス (日本クレア)に、1回の免疫原量を $10 \mu\text{g}$ /マウスとしてFreundの完全アジュバント (Bacto Ad

juvant Complete H37Ra, Difco)と共に皮下注射し、そしてそれぞれ最初の注射の2週間及び3週間後に、Freundの不完全アジュバント(Bacto Adjuvant Incomplete Freund, Difco)と共に同量の免疫原を第二回及び第三回追加免疫として皮下注射した。

【0191】最終免疫感作(第四回注射)は第三回注射の1週間後に、アジュバントを使わないで尾静脈内に行った。免疫感作されたマウスから血清試料を採取し、希釈緩衝液により段階的に希釈し、そしてGoldsmith, P. K., Analytical Biochemistry, 117, 53-60, 1981、に記載されている方法に従ってELISA法により分析した。すなわち、SR344(0.1 $\mu$ g/ml)によりコートされたプレートを1%BSAによりブロックし、そして前記の希釈された試料をそれに加えた。SR344に結合したマウスIgGをヤギの抗マウスIgG/アルカリホスファターゼ(A/P)(ZYMED)及びアルカリホスファターゼ用基質(Sigma-104)を用いて測定した。血清中の抗SR344抗体の増加を確認した後、最終免疫感作から3日後に、5匹のBALB/cマウスから脾臓細胞を得た。脾臓細胞及び骨髓細胞株(P3U1)を25:1の比率で混合し、PEG1500を用いて融合し、そして2000個のウェル中で0.7~1.1 $\times 10^6$ 細胞/ウェルの細胞濃度で培養した。

【0192】ウェルからの上清を、SR344に結合するそれらの能力について(R344認識アッセイと称する第一次スクリーニング)、及びSR344とIL-6Rとの結合を阻害するそれらの能力について(IL-6/sIL6R結合阻害アッセイ(RBIA)による)スクリーニングした。第一次スクリーニングが240個の陽性ウェルをもたらし、そして第二次スクリーニングが36個の陽性ウェルをもたらした。上記のSR344認識アッセイは次の様にして行った。ヤギの抗マウスIg(Cappel)(1 $\mu$ g/ml)によりコートされたプレート(MaxiSorp, Nunc)を1%BSAによりブロックし、そして100 $\mu$ l/ウェルのハイブリドーマ培養上清をそれに添加し、次に室温にて1時間インキュベートした。プレートを洗浄した後、20ng/mlのSR344をウェルに加え、そして室温にて1時間インキュベーションを行った。

## 配列

ACTAGTCGAC ATGAAGTTGC CTGTTAGGCT GTTGGTCTG

40

【0197】配列番号:2

※鎖の数:一本鎖

配列の長さ:39

トポロジー:直鎖状

配列の型:核酸

※ 配列の種類:合成DNA

## 配列

ACTAGTCGAC ATGGAGWCAG ACACACTCCT GYTATGGGT

39

【0198】配列番号:3

50 配列の長さ:40

\*【0193】上清に由来する固定化された抗体により捕捉されたSR344の量を、ラビット抗SR344IgG(#2, 5 $\mu$ g/ml)、ヤギの抗ラビットIgG-アルカリホスファターゼ(A/P)(1:3000, Tago)及び基質(1mg/ml, Sigma-104)の添加、並びにそれに続く405-600nmでの吸光度の測定により定量した。前記のRBIAは次の様にして行った。MT18抗体でコートしたプレートを100ng/mlのSR344(100 $\mu$ l/ウェル)で満たし、そして室温にて1時間インキュベーションを行った。プレートを洗浄した後、50 $\mu$ l/ウェルのハイブリドーマ培養上清及び50 $\mu$ l/ウェルのビオチン-IL-6結合体(20ng/ml)をそれぞれのウェルに同時に加え、そしてウェルを室温にて1時間インキュベートした。

【0194】ストレプトアビジン-A/P(1:7000, PIERCE)及び対応する基質(Sigma-104)を添加し、405-600nmでの吸光度を測定することにより、SR344に結合したビオチン-IL-6の量を測定した。最後に、限界希釈法を2回反復することにより陽性クローンを純化し、そしてSR344とIL-6との結合を阻害する3個のハイブリドーマクローン、すなわちAUK12-20, AUK146-15及びAUK64-7;並びにSR344とIL-6との結合を阻害しないハイブリドーマクローンAUK181-6を得た。

## 【0195】

【発明の効果】本発明はヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体を提供し、この抗体においてはヒト抗体のV領域のCDRがヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のCDRにより置き換えられている。この再構成ヒト抗体の大部分がヒト抗体に由来し、そしてマウスCDRは抗原性が低いから、本発明の再構成ヒト抗体はヒトに対する抗原性が低く、そしてそれ故に療法用として期待される。

## 【0196】

【配列表】配列番号:1

配列の長さ:40

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:合成DNA

\*

53

54

配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖

\* トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAGTGTGC TCACTCAGGT CCTGSGTTG

40

【0199】配列番号：4

※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：43

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAGGRCCC CTGCTCAGWT TYTTGMMWTC TTG

43

【0200】配列番号：5

10 ★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：40

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGATTTWC AGGTGCAGAT TWTCAGCTTC

40

【0201】配列番号：6

☆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：37

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

☆ 配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAGGTKCY YTGYSAGYT YCTGRGG

37

【0202】配列番号：7

20 ◆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：41

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

◆ 配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGGCWTC AAGTGGAGTC ACAKWYYCWG G

41

【0203】配列番号：8

\*鎖の数：一本鎖

配列の長さ：41

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

\* 配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGTGGGGAY CTKTTTYCMM TTTTCAATT G

41

【0204】配列番号：9

30 ※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：35

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGTRTCCW CASCTCAGTT CCTTG

35

【0205】配列番号：10

★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：37

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGTATATAT GTTTGTTGTC TATTTCT

37

【0206】配列番号：11

40 ☆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：38

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

☆ 配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGAAGCCC CAGCTCAGCT TCTCTTCC

38

【0207】配列番号：12

◆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：27

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

◆ 配列の種類：合成DNA

配列

GGATCCCGGG TGGATGGTGG GAAGATG

27

【0208】配列番号：13

50 配列の長さ：37

配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖

\*トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAAATGCA GCTGGGTCAT STTCTTC

37

【0209】配列番号：14

※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：36

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGGATGGA GCTRTATCAT SYTCTT

36

【0210】配列番号：15

10★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：37

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAAGWTGT GGTAAACTG GGTTTTT

37

【0211】配列番号：16

☆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：35

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

☆ 配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGRACCTTG GGYTCAGCTT GRITTT

35

【0212】配列番号：17

20◆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：40

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

◆ 配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGACTCCA GGCTCAATTT AGTTTTCTT

40

【0213】配列番号：18

\*鎖の数：一本鎖

配列の長さ：37

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

\* 配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGCTGTCY TRGSGCTRCT CTTCTGC

37

【0214】配列番号：19

30※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：36

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGRATGGA GCKGGRTCTT TMTCTT

36

【0215】配列番号：20

★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：33

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAGAGTGC TGATTCTTTT GTG

33

【0216】配列番号：21

40☆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：40

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

☆ 配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGMTTGGG TGTGGAMCTT GCTATTCCTG

40

【0217】配列番号：22

◆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：37

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

◆ 配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGGCAGAC TTACATTCTC ATTCCTG

37

【0218】配列番号：23

50 配列の長さ：28

57

58

配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖

\* トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：合成DNA

配列

GGATCCCGGG CCAAGTGGATA GACAGATG

28

【0219】配列番号：24

※生物名：マウス

配列の長さ：393

直接の起源

配列の型：核酸

クローン：p12-k2

鎖の数：二本鎖

特徴：1..60 sig peptide

トポロジー：直鎖状

61..393 mat peptide

配列の種類：cDNA

10 【0220】

起源

※

配列

ATG GAG TCA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA CTG CTG CTC TGG GTT CCA 48

Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

-20 -15 -10 -5

GGT TCC ACT GGT GAC ATT GTG CTG ACA CAG TCT CCT GCT TCC TTA GGT 96

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Gly

1

5

10

GTA TCT CTG GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCA TGC AGG GCC AGC AAA AGT 144

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser

15

20

25

GTC AGT ACA TCT GGC TAT AGT TAT ATG CAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA 192

Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

30

35

40

GGA CAG ACA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CTT GCA TCC AAC CTA GAA TCT 240

Gly Gln Thr Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

45

50

55

60

GGG GTC CCT GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC 288

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

65

70

75

CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT 336

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys

80

85

90

CAG CAC AGT AGG GAG AAT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG 384

Gln His Ser Arg Glu Asn Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

95

100

105

GAA ATA AAA 393

Glu Ile Lys

110

【0221】配列番号：25

40 生物名：マウス

配列の長さ：405

直接の起源

配列の型：核酸

クローン：p12-h2

鎖の数：二本鎖

特徴：1..57 sig peptide

トポロジー：直鎖状

58..405 mat peptide

配列の種類：cDNA

【0222】

起源

配列

ATG GGA TGG AGC GGG ATC TTT CTC TTC CTT CTG TCA GGA ACT GCA GGT 48

Met Gly Trp Ser Gly Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

-15

-10

-5

59	60
GTC CAC TCT GAG ATC CAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG ATG AAG	96
Val His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys	
-1 5 10	
CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATA TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC TCA TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
15 20 25	
ACT AGC TAT TAC ATA CAC TGG GTG AAG CAG AGC CAT GGA AAG AGC CTT	192
Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATT GGA TAT ATT GAT CCT TTC AAT GGT GGT ACT AGC TAC AAC	240
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Phe Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn	
50 55 60	
CAG AAA TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTT GAC AAA TCT TCC AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG CAT CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC	336
Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCA AGG GGG GGT AAC CGC TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Asn Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly	
95 100 105	
ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA	405
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	
110 115	

【0223】配列番号：26

配列の長さ：381

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：マウス

直接の起源

クローン：pPM-k3

特徴：1..60 sig peptide

61..381 mat peptide

30 【0224】

配列

ATG GTG TCC TCA GCT CAG TTC CTT GGT CTC CTG TTG CTC TGT TTT CAA	48
Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Gln	
-20 -15 -10 -5	
GGT ACC AGA TGT GAT ATC CAG ATG ACA CAG ACT ACA TCC TCC CTG TCT	96
Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser	
1 5 10	
GCC TCT CTG GGA GAC AGA GTC ACC ATC AGT TGC AGG GCA AGT CAG GAC	144
Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp	
15 20 25	
ATT AGC AGT TAT TTA AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAT GGA ACT ATT	192
Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile	
30 35 40	
AAA CTC CTG ATC TAC TAC ACA TCA AGA TTA CAC TCA GGA GTC CCA TCA	240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser	
45 50 55 60	
AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGA ACA GAT TAT TCT CTC ACC ATT AAC	288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn	
65 70 75	



61 62  
 AAC CTG GAG CAA GAA GAC ATT GCC ACT TAC TTT TGC CAA CAG GGT AAC 336  
 Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn  
 80 85 90  
 ACG CTT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAT 381  
 Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn  
 95 100 105

【0225】配列番号：27

配列の長さ：411

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖鎖

鎖の数：二本鎖

配列の種類：cDNA

\*起源

生物名：マウス

直接の起源

10 クローン：pPM-h1

特徴：1..54 sig peptide

55..411 mat peptide

\* 【0226】

配列

ATG AGA GTG CTG ATT CTT TTG TGG CTG TTC ACA GCC TTT CCT GGT ATC 48  
 Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile  
 -15 -10 -5  
 CTG TCT GAT GTG CAG CTT CAG GAG TCG GGA CCT GTC CTG GTG AAG CCT 96  
 Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro  
 -1 5 10  
 TCT CAG TCT CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC ACT GGC TAC TCA ATC ACC 144  
 Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr  
 15 20 25 30  
 AGT GAT CAT GCC TGG AGC TGG ATC CGG CAG TTT CCA GGA AAC AAA CTG 192  
 Ser Asp His Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu  
 35 40 45  
 GAG TGG ATG GGC TAC ATA AGT TAC AGT GGT ATC ACT ACC TAC AAC CCA 240  
 Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro  
 50 55 60  
 TCT CTC AAA AGT CGA ATC TCT ATC ACT CGA GAC ACA TCC AAG AAC CAG 288  
 Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
 65 70 75  
 TTC TTC CTA CAG TTG AAT TCT GTG ACT ACT GGG GAC ACG TCC ACA TAT 336  
 Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Gly Asp Thr Ser Thr Tyr  
 80 85 90  
 TAC TGT GCA AGA TCC CTA GCT CGG ACT ACG GCT ATG GAC TAC TGG GGT 384  
 Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
 95 100 105 110  
 CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA 411  
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

【0227】配列番号：28

配列の長さ：393

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：マウス

直接の起源

クローン：p64-k4

特徴：1..60 sig peptide

61..393 mat peptide

【0228】

配列

ATG GAG TCA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTG CTG CTG CTC TGG GTT CCA 48

63		64
Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro		
-20	-15	-10
GGT TCC ACA GGT GAC ATT GTG TTG ATC CAA TCT CCA GCT TCT TTG GCT		96
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Ile Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala		
-1	5	10
GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATA TCC TGC AGA GCC AGT GAA AGT		144
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser		
15	20	25
GTT GAT AGT TAT GGC AAT AGT TTT ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAA CCA		192
Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro		
30	35	40
GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CGT GCA TCC AAC CTA GAA TCT		240
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser		
45	50	55
GGG ATC CCT GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT AGG ACA GAC TTC ACC		288
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr		
65	70	75
CTC ACC ATT AAT CCT GTG GAG GCT GAT GAT GTT GCA ACC TAT TAC TGT		336
Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys		
80	85	90
CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG		384
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu		
95	100	105
GAG CTG AAA		393
Glu Leu Lys		
110		

【0229】配列の番号：29

配列の長さ：417

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：マウス

直接の起源

クローン：p64-h2

30 特徴：1..57 sig peptide

58..417 mat peptide

【0230】

配列

ATG GGA TGG AGC GGG GTC TTT ATC TTC CTC CTG TCA GTA ACT GCA GGT	48
Met Gly Trp Ser Gly Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly	
-15 -10 -5	
GTC CAC TCC CAG GTT CAA TTG CAG CAG TCT GGA GCT GAG TTG ATG AAG	96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys	
-1 5 10	
CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATC TCC TGC AAG GCT ACT GGC TAC ACA TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
AGT AGT TAT TGG ATA GTG TGG ATA AAG CAG AGG CCT GGA CAT GGC CTT	192
Ser Ser Tyr Trp Ile Val Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATT GGA GAG ATT TTA CCT GGA ACC GGT AGT ACT AAC TAC AAT	240
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Thr Gly Ser Thr Asn Tyr Asn	
50 55 60	
GAG AAA TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTC ACT GCA GAT ACA TCT TCC AAC	288

65 66  
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn  
 65 70 75  
 ACA GCC TAC ATG CAA CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCC GTC 336  
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 80 85 90  
 TAT TAC TGT GCA AGT CTA GAC AGC TCG GGC TAC TAT GCT ATG GAC TAT 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Ser Leu Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
 95 100 105  
 TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA 417  
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 110 115 120

【0231】配列の番号：30

配列の長さ：381

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

\*生物名：マウス

直接の起源

クローン：p146-k3

特徴：1..60 sig peptide

61..381 mat peptide

【0232】

\*

配列

ATG GTG TCC ACA CCT CAG TTC CTT GGT CTC CTG TTG ATC TGT TTT CAA 48  
 Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Gly Leu Leu Ile Cys Phe Gln  
 -20 -15 -10 -5  
 GGT ACC AGA TGT GAT ATC CAG ATG ACA CAG ACT ACA TCC TCC CTG TCT 96  
 Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser  
 -1 5 10  
 GCC TCT CTG GGA GAC AGA GTC ACC ATC AGT TGC AGG GCA AGT CAG GAC 144  
 Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp  
 15 20 25  
 ATT AGT AAT TAT TTA AAC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GAT GGA ACT GTT 192  
 Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val  
 30 35 40  
 AAA CTC CTG ATC TAC TAT ACA TCA AGA TTA CAC TCA GGA GTC CCA TCA 240  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser  
 45 50 55 60  
 AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGA ACA GAT TAT TCT CTC ACC ATT AGC 288  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75  
 AAC CTG GAG CAA GAA GAT ATT GCC AGT TAC TTT TGC CAA CAG GGT TAT 336  
 Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Tyr  
 80 85 90  
 ACG CCT CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG TTG GAA ATC AAA 381  
 Thr Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 95 100 105

【0233】配列番号：31

配列の長さ：402

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：マウス

直接の起源

クローン：p146-h1

特徴：1..51 sig peptide

52..402 mat peptide

【0234】

50

67	68
配列	
ATG GAG CTG GAT CTT TAT CTT ATT CTG TCA GTA ACT TCA GGT GTC TAC	48
Met Glu Leu Asp Leu Tyr Leu Ile Leu Ser Val Thr Ser Gly Val Tyr	
-15 -10 -5	
TCA CAG GTT CAG CTC CAG CAG TCT GGG GCT GAG CTG GCA AGA CCT GGG	96
Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly	
-1 5 10 15	
GCT TCA GTG AAG TTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT AAC	144
Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn	
20 25 30	
TAC TGG GTG CAG TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG	192
Tyr Trp Val Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp	
35 40 45	
ATT GGG TCT ATT TAT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG AAC ACT CAG AAG	240
Ile Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Asn Thr Gln Lys	
50 55 60	
TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAT AAA TCC TCC ATC ACA GCC	288
Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ile Thr Ala	
65 70 75	
TAC ATG CAA CTC ACC AGC TTG GCA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC	336
Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr	
80 85 90 95	
TGT GCA AGA TCG ACT GGT AAC CAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC	384
Cys Ala Arg Ser Thr Gly Asn His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
100 105 110	
ACT CTC ACA GTC TCC TCA	402
Thr Leu Thr Val Ser Ser	
115	

【0235】配列番号：32

配列の長さ：35

配列の型：核酸

\*鎖の数：一本鎖

30 トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：合成DNA

配列

ACAAAGCTTC CACCATGGAG TCAGACACAC TCCTG

35

【0236】配列番号：33

配列の長さ：36

配列の型：核酸

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：合成DNA

配列

GGCTAAGCTT CCACCATGGG ATGGAGCGGG ATCTTT

36

【0237】配列番号：34

配列の長さ：35

配列の型：核酸

★鎖の数：一本鎖

40 トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：合成DNA

配列

CTTGGATCCA CTCACGTTTT ATTTCCAGCT TGGTC

35

【0238】配列番号：35

配列の長さ：36

配列の型：核酸

☆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：合成DNA

配列

GTTGGATCCA CTCACCTGCA GAGACAGTTA CCAGAG

36

【0239】配列番号：36

配列の長さ：35

配列の型：核酸

50 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CTTGGATCCA CTCACGATTT ATTTCCAGCT TGGTC

35

【0240】配列番号：37

\*鎖の数：一本鎖

配列の長さ：35

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

\* 配列の種類：合成DNA

配列

CTTGGATCCA CTCACGTTTT ATTTCCAGCT TGGTC

35

【0241】配列番号：38

※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：36

10 トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：合成DNA

配列

ACAAAGCTTC CACCATGGTG TCCTCAGCTC AGTTCC

36

【0242】配列番号：39

★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：39

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：合成DNA

配列

TGTTAGATCT ACTCACCTGA GGAGACAGTG ACTGAGGTT

39

【0243】配列番号：40

☆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：36

20 トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

☆ 配列の種類：合成DNA

配列

GTCTAAGCTT CCACCATGAG AGTGCTGATT CTTTTG

36

【0244】配列番号：41

◆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：17

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

◆ 配列の種類：合成DNA

配列

TACGCAAACC GCCTCTC

17

【0245】配列番号：42

\*鎖の数：一本鎖

配列の長さ：18

30 トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

\* 配列の種類：合成DNA

配列

GAGTGCACCA TATGCGGT

18

【0246】配列番号：43

※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：55

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：合成DNA

配列

ACCGTGTCTG GCTACACCTT CACCAGCGAT CATGCCTGGA GCTGGGTGAG ACAGC

55

【0247】配列番号：44

★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：63

40 トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：合成DNA

配列

TGAGTGGATT GGATACATTA GTTATAGTGG AATCACAACC TATAATCCAT

63

CTCTCAAATC CAG

【0248】配列番号：45

☆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：54

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

☆ 配列の種類：合成DNA

配列

TATTATTGTG CAAGATCCCT AGCTCGGACT ACGGCTATGG ACTACTGGGG TCAA

54

【0249】配列番号：46

50 配列の長さ：27

71

72

配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖

配列

GTGACAATGC TGAGAGACAC CAGCAAG

【0250】配列番号：47

配列の長さ：24

配列の型：核酸

配列

GGTGTCCACT CCGATGTCCA ACTG

【0251】配列番号：48

配列の長さ：27

配列の型：核酸

配列

GGTCTTGAGT GGATGGGATA CATTAGT

【0252】配列番号：49

配列の長さ：29

配列の型：核酸

配列

GTGTCTGGCT ACTCAATTAC CAGCATCAT

【0253】配列番号：50

配列の長さ：48

配列の型：核酸

配列

TGTAGAGCCA GCCAGGACAT CAGCAGTTAC CTGAACTGGT ACCAGCAG

【0254】配列番号：51

配列の長さ：42

配列の型：核酸

配列

ATCTACTACA CCTCCAGACT GCACTCTGGT GTGCCAAGCA GA

【0255】配列番号：52

配列の長さ：50

配列の型：核酸

配列

ACCTACTACT GCCAACAGGG TAACACGCTT CCATACACGT TCGGCCAAGG

【0256】配列番号：53

配列の長さ：27

配列の型：核酸

配列

AGCGGTACCG ACTACACCTT CACCATC

【0257】配列番号：54

配列の長さ：706

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：pUC-RVh-PMIf

【0258】特徴：ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト化PM

\*トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：合成DNA

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：合成DNA

10★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：合成DNA

☆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：合成DNA

20◆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：合成DNA

\*鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：合成DNA

30※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：合成DNA

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：合成DNA

40 -1抗体のH鎖V領域バージョン(f)及びそれをコードする遺伝子

アミノ酸 -19-1: leader

アミノ酸 1-30: FR1

アミノ酸 31-36: CDR1

アミノ酸 37-50: FR2

アミノ酸 51-66: CDR2

アミノ酸 67-98: FR3

アミノ酸 99-108: CDR3

アミノ酸 109-119: FR4

50 ヌクレオチド 1-6 Hind III 部位

ヌクレオチド 54-135	73	intron	74	*ヌクレオチド 701-706	Bam HI 部位
ヌクレオチド 258-348		intron/aberrant splicing		【0259】	
ヌクレオチド 505-706		intron		*	
配列					
AAGCTTC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT					49
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala					
	-15		-10		
ACA G GTAAGGGGCT CACAGTAGCA GGCTTGAGGT CTGGACATAT ATATGGGTGA					103
Thr					
-5					
CAATGACATC CACTTTGCCT TTCTCTCCAC AG GT GTC CAC TCC CAG GTC CAA					155
Gly Val His Ser Gln Val Gln					
			1		
CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT CTT GTG AGA CCT AGC CAG ACC CTG AGC					203
Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser					
5 10 15					
CTG ACC TGC ACC GTG TCT GGC TAC TCA ATT ACC AGC GAT CAT GCC TGG					251
Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp His Ala Trp					
20 25 30 35					
AGC TGG GTG AGA CAG CCA CCT GGA CGA GGT CTT GAG TGG ATT GGA TAC					299
Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr					
40 45 50					
ATT AGT TAT AGT GGA ATC ACA ACC TAT AAT CCA TCT CTC AAA TCC AGA					347
Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg					
55 60 65					
GTG ACA ATG CTG AGA GAC ACC AGC AAG AAC CAG TTC AGC CTG AGA CTC					395
Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu					
70 75 80					
AGC AGC GTG ACA GCC GCC GAC ACC GCG GTT TAT TAT TGT GCA AGA TCC					443
Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser					
85 90 95					
CTA GCT CGG ACT ACG GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGC AGC CTC GTC					491
Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val					
100 105 110 115					
ACA GTC TCC TCA G GTGAGTCCTT ACAACCTCTC TCTTCTATTC AGCTTAAATA					544
Thr Val Ser Ser					
GATTTTACTG CATTGTTGG GGGGAAATG TGTGTATCTG AATTTCAGGT CATGAAGGAC					604
TAGGGACACC TTGGGAGTCA GAAAGGGTCA TTGGGAGCCC GGGCTGATGC AGACAGACAT					664
CCTCAGCTCC CAGACTTCAT GGCCAGAGAT TTATAGGGAT CC					706

【0260】配列番号：55

配列の長さ：506

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：pUC-RV1-PM1a

【0261】特徴：ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト化PM

40 -1抗体のL鎖V領域バージョン(a)及びそれをコードする遺伝子

アミノ酸 -19-1：leader

アミノ酸 1-23：FR1

アミノ酸 24-34：CDR1

アミノ酸 35-49：FR2

アミノ酸 50-56：CDR2

アミノ酸 57-88：FR3

アミノ酸 89-97：CDR3

アミノ酸 98-117：FR4

50 ヌクレオチド 1-6：Hind III 部位

75

76

ヌクレオチド 54-135: intron

\*ヌクレオチド 501-506: Bam HI 部位

ヌクレオチド 268-376: intron/aberrant splicing

【0262】

ヌクレオチド 469-506: intron

\*

配列

AAGCTTC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT 49

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala

-15

-10

ACA G GTAAGGGGCT CACAGTAGCA GGCTTGAGGT CTGGACATAT ATATGGGTGA 103

Thr

-5

CAATGACATC CACTTTGCCT TTCTCTCCAC AG GT GTC CAC TCC GAC ATC CAG 155

Gly Val His Ser Asp Ile Gln

1

ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG 203

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val

5

10

15

ACC ATC ACC TGT AGA GCC CAG GAC ATC AGC AGT TAC CTG AAT TGG 251

Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp

20

25

30

35

TAC CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC TAC ACC 299

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr

40

45

50

TCC AGA CTG CAC TCT GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC 347

Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

55

60

65

GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC 395

Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile

70

75

80

GCT ACC TAC TAC TGC CAA CAG GGT AAC ACG CTT CCA TAC ACG TTC GGC 443

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly

85

90

95

CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA C GTGAGTAGAA TTAAACTTT 488

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

GCTTCCTCAG TTGGATCC

506

【0263】配列番号: 56

配列の長さ: 438

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成

起源

生物名: マウス及びヒト

直接の起源

クローン: pUC-RVh-PMIf-4

【0264】特徴: ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト化PM

-1抗体のH鎖V領域バージョン(f)及びそれをコードす

配列

AAGCTTCCAC C ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA 50

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr

る遺伝子であって、intronが除去されたもの。

アミノ酸 -19-1: leader

アミノ酸 1-30: FR1

アミノ酸 31-36: CDR1

40 アミノ酸 37-50: FR2

アミノ酸 51-66: CDR2

アミノ酸 67-98: FR3

アミノ酸 99-108: CDR3

アミノ酸 109-119: FR4

ヌクレオチド 1-6: Hind III 部位

ヌクレオチド 432-438: Bam HI 部位

【0265】



77

78

-15                      -10

GCT ACA GGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT    98  
 Ala Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly  
      -5                      1                      5                      10

CTT GTG AGA CCT AGC CAG ACC CTG AGC CTG ACC TGC ACC GTG TCT GGC    146  
 Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly  
                              15                      20                      25

TAC TCA ATT ACC AGC GAT CAT GCC TGG AGC TGG GTT CGC CAG CCA CCT    194  
 Tyr Ser Ile Thr Ser Asp His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro  
                              30                      35                      40

GGA CGA GGT CTT GAG TGG ATT GGA TAC ATT AGT TAT AGT GGA ATC ACA    242  
 Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr  
                              45                      50                      55

ACC TAT AAT CCA TCT CTC AAA TCC AGA GTG ACA ATG CTG AGA GAC ACC    290  
 Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr  
                              60                      65                      70

AGC AAG AAC CAG TTC AGC CTG AGA CTC AGC AGC GTG ACA GCC GCC GAC    338  
 Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp  
      75                      80                      85                      90

ACC GCG GTT TAT TAT TGT GCA AGA TCC CTA GCT CGG ACT ACG GCT ATG    386  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met  
                              95                      100                      105

GAC TAC TGG GGT CAA GGC AGC CTC GTC ACA GTC TCC TCA G GTGAGTGGAT    436  
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser  
                              110                      115

CC

438

【0266】配列番号：57

配列の長さ：402

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：pUC-RV1-PM1a

【0267】特徴：ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト化PM

-1抗体のL鎖V領域バージョン(a)及びそれをコードす

配列

AAGCTTCCAC C ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA    50  
                              Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr  
    -15                      -10

GCT ACA GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC    98  
 Ala Thr Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
      -5                      1                      5                      10

CTG AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AGA GCC AGC    146  
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
                              15                      20                      25

CAG GAC ATC AGC AGT TAC CTG AAT TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA AAG    194  
 Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

る遺伝子であって、intronが除去されたもの。

アミノ酸 -19-1:leader

アミノ酸 1-23:FR1

30 アミノ酸 24-34:CDR1

アミノ酸 35-49:FR2

アミノ酸 50-56:CDR2

アミノ酸 57-88:FR3

アミノ酸 89-97:CDR3

アミノ酸 98-107:FR4

ヌクレオチド 1-6 : Hind III 部位

ヌクレオチド 397-402: Bam HI 部位

【0268】

79

80

30 35 40  
 GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC TAC ACC TCC AGA CTG CAC TCT GGT GTG 242  
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val  
 45 50 55  
 CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC 290  
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr  
 60 65 70  
 ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCT ACC TAC TAC TGC CAA CAG 338  
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 75 80 85 90  
 GGT AAC ACG CTT CCA TAC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC 386  
 Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 95 100 105  
 AAA C GTGAGTGGAT CC 402  
 Lys

【0269】配列番号：58

配列の長さ：36

配列の型：核酸

\*鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：合成DNA

配列

TAAGGATCCA CTCACCTGAG GAGACTGTGA CGAGGC 36

【0270】配列番号：59

配列の長さ：32

配列の型：核酸

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：合成DNA

配列

ATCAAGCTTC CACCATGGGA TGGAGCTGTA TC 32

【0271】配列番号：60

配列の長さ：30

配列の型：核酸

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：合成DNA

配列

AATGGATCCA CTCACGTTTG ATTTCCACCT 30

【0272】配列番号：61

配列の長さ：33

配列の型：核酸

☆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：合成DNA

配列

CATGCCCTGGA GCTGGGTTCTG CCAGCCACCT GGA 33

【0273】配列番号：62

配列の長さ：33

配列の型：核酸

◆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：合成DNA

配列

TCCAGGTGGC TGGCGAACCC AGCTCCAGGC ATG 33

【0274】配列番号：63

配列の長さ：30

配列の型：核酸

\*鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：合成DNA

配列

CAGCAGAAGC CAGGAAAGGC TCCAAAGCTG 30

【0275】配列番号：64

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CAGCTTTGGA GCCTTTCCTG GCTTCTGCTG 30

## 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明の抗体ペプチドの発現のために有用な、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）プロモーター／エンハンサー系を含んで成る発現ベクターを示す。

【図2】図2は、ヒトIL-6Rに結合する本発明のキメラ抗体AUK12-20の能力の確認のためのELISAの結果を示すグラフである。

【図3】図3は、ヒトIL-6RへのIL-6の結合を阻害する本発明のキメラ抗体AUK12-20の能力の確認のためのELISAの結果を示すグラフである。

【図4】図4は、IL-6Rへの本発明のキメラ抗体PM1a及びPM1bの結合についてのELISAの結果を示すグラフである。

【図5】図5は、IL-6RへのIL-6の結合を阻害する本発明のキメラ抗体PM1a及びPM1bの能力を試験するELISAの結果を示すグラフである。

【図6】図6は、再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域の第一バージョン（バージョン「a」）の作製のダイアグラムである。

【図7】図7は、再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の第一バージョン（バージョン「a」）の作製のダイアグラムである。

【図8】図8は、H鎖の発現のために有用な、ヒト・エロンゲーション・ファクター1 $\alpha$ （HEF-1 $\alpha$ ）プロモーター／エンハンサーを含んで成る発現プラスミドHEF-12h-g $\gamma$ 1の作製の過程を示す。

【図9】図9は、H鎖の発現のために有用な、HEF-

1 $\alpha$ プロモーター／エンハンサー系を含んで成る発現プラスミドHEF-12k-gkの作製の過程を示す。

【図10】図10は、H鎖の発現のために有用な、増幅のための欠陥SV40プロモーター／エンハンサー配列に連結されたジヒドロフォレートレダクターゼ（dhfr）及びHCMVプロモーター／エンハンサーを含んで成る発現プラスミドDHFR-PMh-g $\gamma$ 1の作製の過程を示す。

【図11】図11は、H鎖の発現のために有用な、増幅のための欠陥SV40プロモーター／エンハンサー配列に連結されたdhfr遺伝子及びEF1 $\alpha$ プロモーター／エンハンサーを含んで成る発現プラスミドDHFR- $\Delta$ E-RVh-PM1-fの作製の過程を示す。

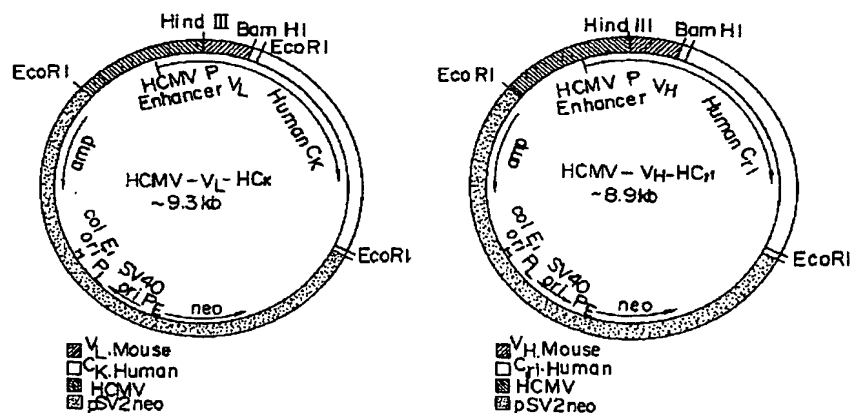
【図12】図12は、ヒトIL-6Rへの結合についての再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域のバージョン「a」及び「b」の能力を示すグラフである。

【図13】図13は、ヒトIL-6Rへの結合についての再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域のバージョン「f」+再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域バージョン「a」の能力を示すグラフである。

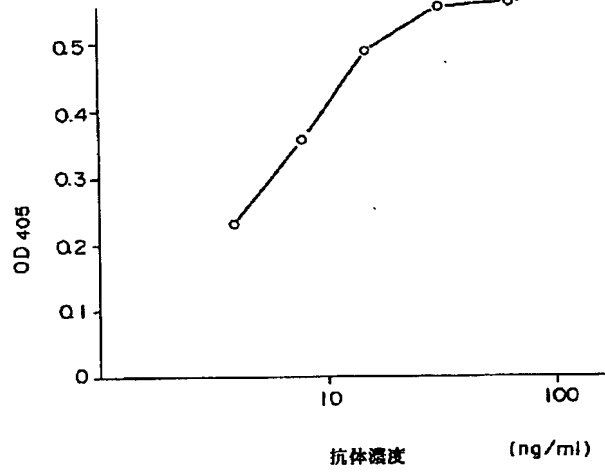
【図14】図14は、IL-6Rへの再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域のバージョン「f」+再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域バージョン「a」の結合を阻害するヒトIL-6の能力を示すグラフである。

【図15】図15は、それぞれL鎖及びH鎖の発現のために有用な、ヒトEF1 $\alpha$ プロモーター／エンハンサーを含んで成る発現プラスミドHEF-VL-gk及びHEF-VH-g $\gamma$ 1を示す。

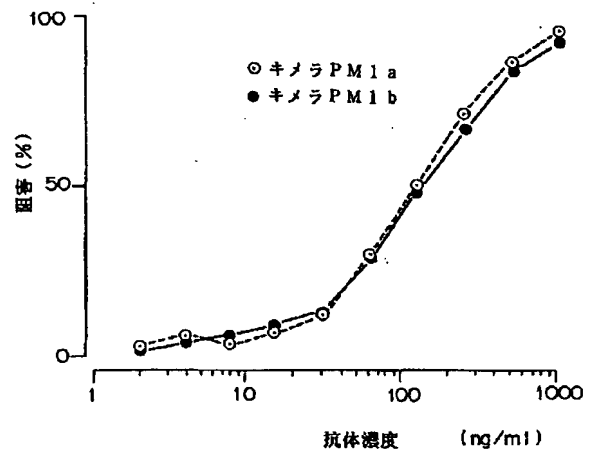
【図1】



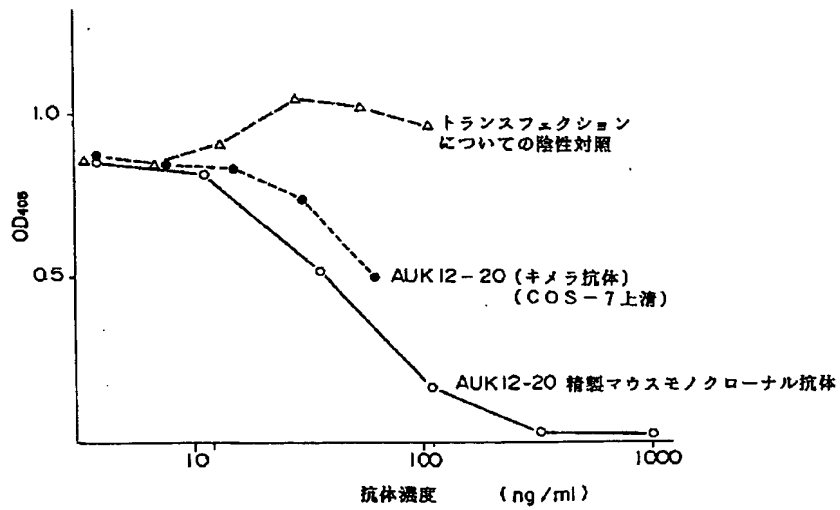
【図2】



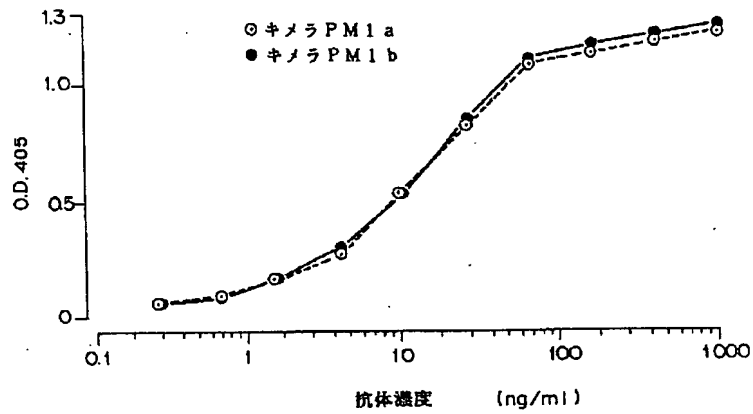
【図5】



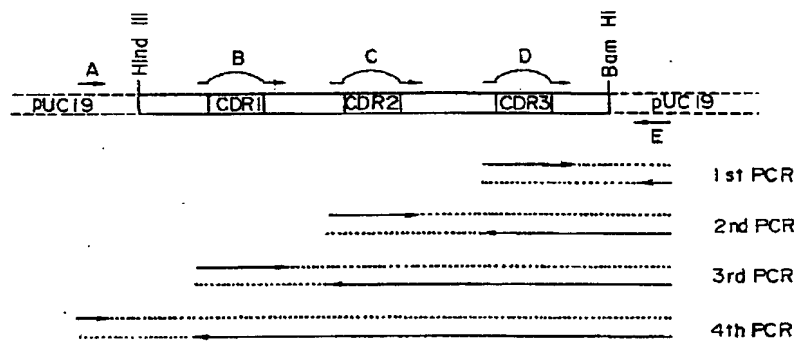
【図3】



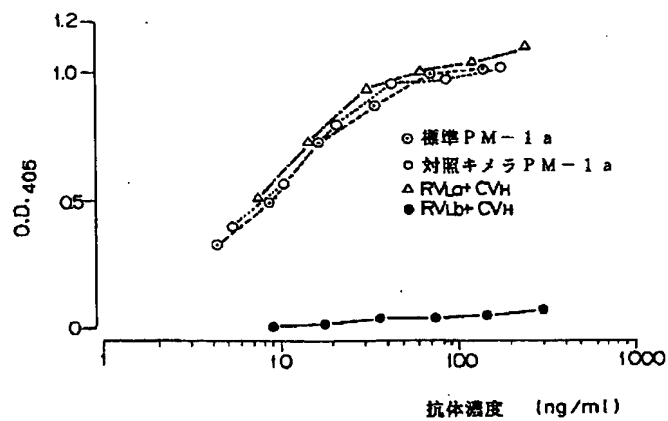
【図4】



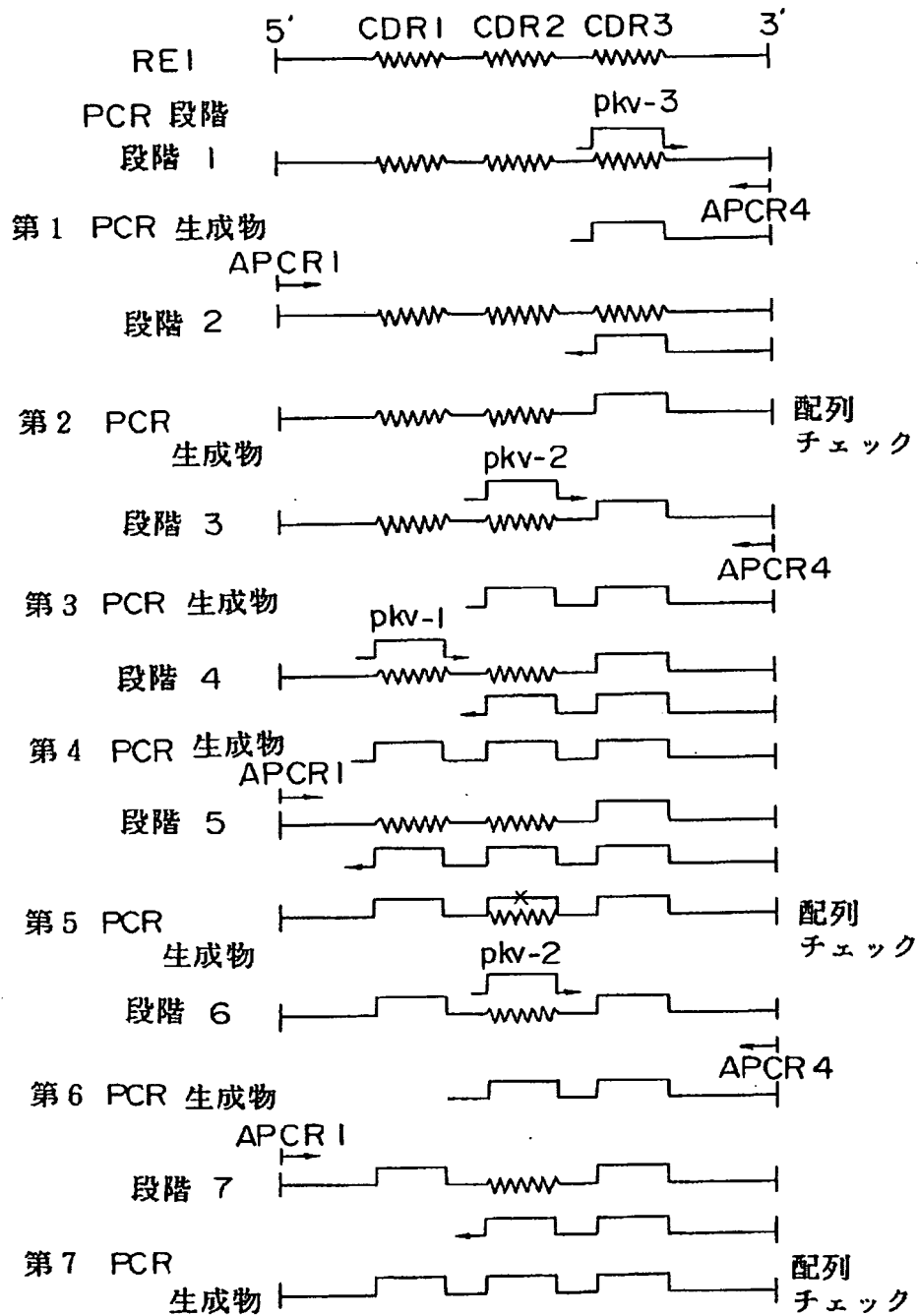
【図6】



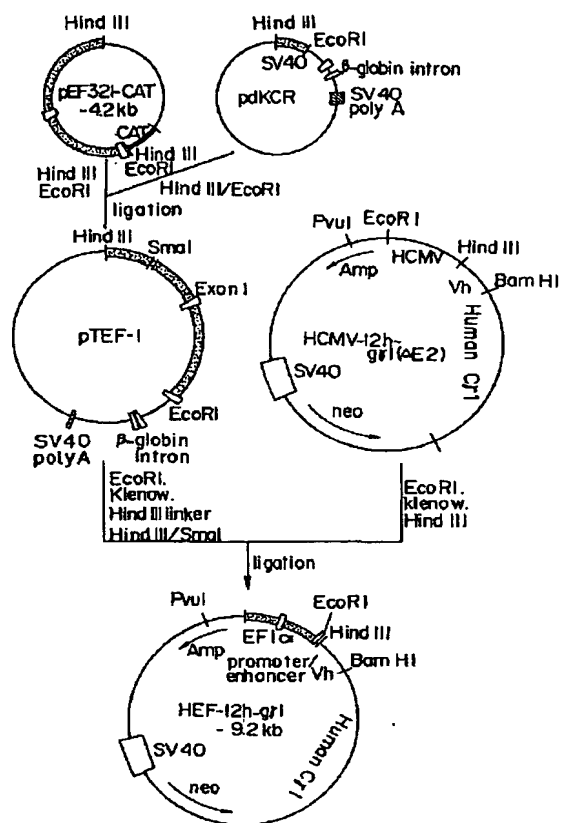
【図12】



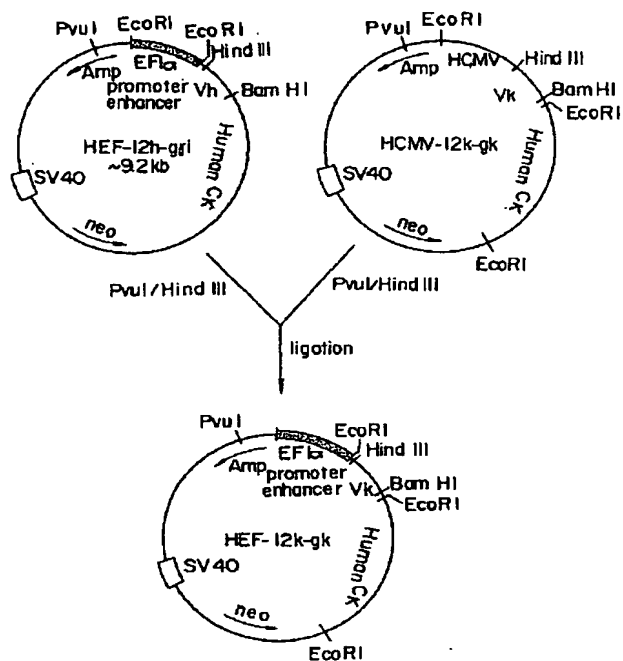
【図7】



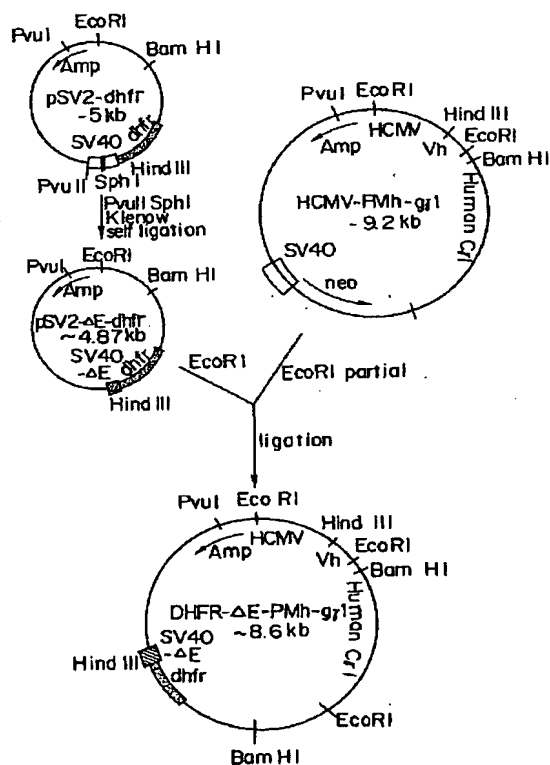
【図8】



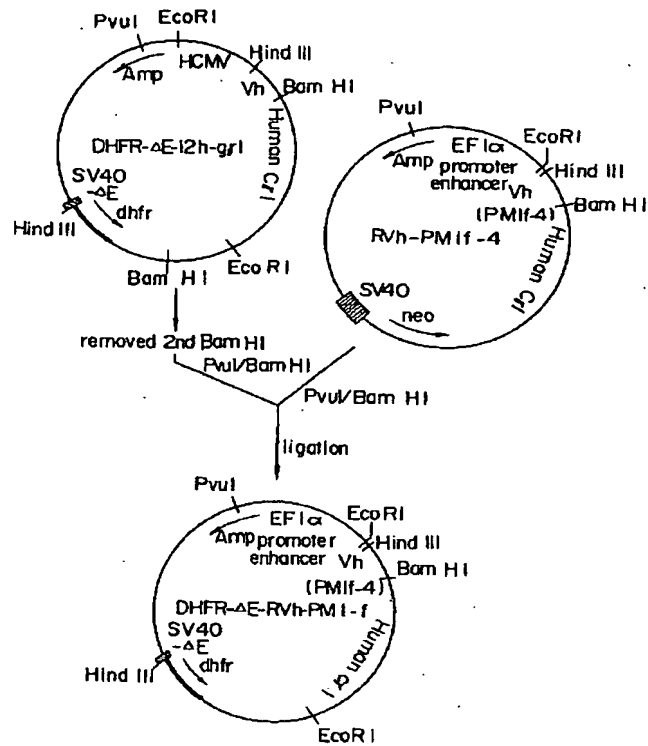
【図9】



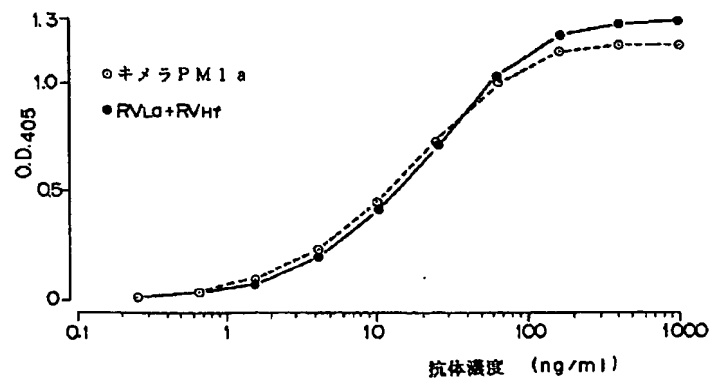
【図10】



【図11】



【図13】





Antibody Concentration (ng/ml)	Chimera PM1a (%)	Mouse PM1 (%)	RVLq+RVHr (%)
1	0	0	0
10	10	5	10
100	60	40	55
1000	95	90	95
10000	100	100	100

HEF-VL-gk ~9.6 kb

HEF-VH-gr1 ~9.2 kb

Legend:

- VL Mouse
- C $\gamma$  Human
- Human EF1 $\alpha$
- pSV2neo

### 技術表示箇所

A

(72)発明者   メアリー   マーガレット   ベンディック  
イギリス国,   ロンドン   エヌダブリュ6  
1   ティーエックス, ウェスト   ハンプス  
テッド,   ソレント   ロード   64

(72)発明者   スティーブン   タレン   ジョーンズ  
イギリス国,   ハートフォードシャイヤー  
ダブリュディー7   8   エイチエー,  
ラッドレット,   ザ   クローズ   10

(72)発明者   ホセ   ウィリアム   サルダナ  
イギリス国,   ミドルセックス   イーエヌ  
1   1   ティーイー, エンフィールド,   リ  
ンカーン   ウェイ   22